Staphylococcus aureus se met transitoirement en dormance pour utiliser les acides gras de l'hôte et échapper à une inhibition par un anti-FASII : quel signal active son réveil ?

Gérald Kénanian

▶ **To cite this version:**

Gérald Kénanian. Staphylococcus aureus se met transitoirement en dormance pour utiliser les acides gras de l'hôte et échapper à une inhibition par un anti-FASII : quel signal active son réveil ?. Bactériologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS242 . tel-02937441

HAL Id: tel-02937441

https://theses.hal.science/tel-02937441

Submitted on 14 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université PARIS-SACLAY

NNT : 2018SACLS242

Thèse de doctorat

Staphylococcus aureus se met transitoirement en dormance pour utiliser les acides gras de l'hôte et échapper à une inhibition par un anti-FASII : quel signal active son réveil ?

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : microbiologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 13 septembre 2018, par

Gérald Kénanian

Composition du Jury :

Nicolas Bayan Professeur, Université Paris-Sud	Président
Emmanuelle Bouveret Directrice de recherche, HDR, Institut Pasteur	Rapportrice
Nienke Buddelmeijer Chargé de recherche, HDR, Institut Pasteur	Rapportrice
Sarah Dubrac Chargé de recherche, HDR, Institut Pasteur	Examinatrice
Alexandra Gruss Directrice de recherche, HDR, INRA – Institut Micalis	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury d'avoir accepté de lire et de juger ce travail qui représente 3 ans de ma vie. Un grand merci à Madame Emmanuelle Bouveret, Madame Nienke Buddelmeijer, Madame Sarah Dubrac et Monsieur Nicolas Bayan.

Les membres du comité de thèse ont eu un rôle de suivi important. Je remercie donc chaleureusement Philippe Bouloc et Sarah Dubrac. Merci à toi Sarah qui m'a permis de réaliser mon stage de M2 à l'Institut Pasteur, et qui m'a encouragé dans la préparation du concours doctoral avec Sandy en me laissant, notamment, me « cacher » afin d'avoir des entrainements téléphoniques avec Sandy.

Je tiens ensuite à remercier mes parents sans qui je ne n'aurais pas pu me retrouver ici aujourd'hui. Ils ont toujours souhaité que leurs enfants puissent faire de grandes études. J'espère que vous êtes fiers d'avoir deux enfants docteurs!

Un petit mot pour mon frère qui a toujours voulu mettre de la compétition entre nous. Il faut croire que ça nous réussit.

La plus importante est sans aucune mesure Sandy. Merci et encore merci de m'avoir choisi pour présenter ce sujet à l'Ecole Doctorale, de m'avoir entraîné pour le concours, et de m'avoir soutenu durant ces trois années. J'ai eu au sein de ton laboratoire les expertises et les financements nécessaires pour mener à bien ce projet. Je pense pouvoir dire que j'ai été chanceux d'avoir une directrice de thèse comme toi. Je n'ai manqué de rien, et j'ai même eu le droit à un soutien moral dès 6h00 du matin. C'est pour dire!

Merci pour ton optimisme sans faille et ta présence, et merci de m'avoir fait confiance tout au long de cette aventure. Merci de m'avoir permis de faire les formations que je souhaitais, telles que la formation à l'expérimentation animale ou le DUGBM. Ce diplôme m'a permis d'élargir mon champ de vision sur les possibilités offertes après l'obtention d'une thèse en biologie, ainsi que de découvrir le monde de la valorisation scientifique. Encore merci de m'avoir autorisé à ne pas être présent au laboratoire de nombreux jeudis pour les besoins de ma mission doctorale…

Merci aux financeurs de ce projet, notamment à l'Ecole Doctorale qui a cru en ce sujet et à ce duo étudiant / chercheur.

Merci à toutes les personnes du laboratoire qui m'ont soutenu. Une pensée pour les anciens doctorants du laboratoire Laetitia et Benjamin, et toutes les personnes de passage comme Clémentine, Jean-Baptiste, Laura, Damien et le futur docteur Vincent.

Je n'oublie pas le temps passé à la SATT et à la FCS où j'ai effectué ma mission complémentaire de valorisation scientifique pendant ces 3 années. 32 jours ou encore 1/6ème du temps de thèse ça compte. Ce fut un bol d'air une journée par semaine. Merci à Tania, Florian, Jessica, Arnaud, Sana, Doriane, Alexandre, Jean, Sylvain, Rémi, Michael et tous les

autres membres de la SATT. J'ai pu apprendre de nombreuses choses avec vous. Je vais surtout retenir une chose, la persévérance!

Je remercie toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin à la réussite de ce projet.

Merci à toutes les personnes de l'équipe Microbadapt et aux membres de l'Institut Micalis. Une petite pensée pour Sylviane et nos moments de doutes face à nos reads et pour m'avoir présenté pour la première fois PATRIC.

Merci à Coralie de m'avoir supporté et aidé moralement, ainsi que pour les multiples sessions (parfois interminables) de relecture, correction et mise en page. Cette thèse est le fruit d'un travail d'équipe aussi bien au laboratoire qu'à la maison. Un bout de toi est présent dans ces pages. Merci !

Je finirai par dire que malgré tous les déboires expérimentaux, le travail finit toujours par payer. Même si les résultats espérés sont longs à venir et ne correspondent pas toujours à ce que l'on désire, il y a de quoi être fier.

Un problème sans solution est un problème mal posé.
Albert Einstein

A mes parents…

Table des matières

Table des matières……6

Abréviations……8

Synthèse bibliographique……9

I) *Staphylococcus aureus*……10

1) La découverte de *Staphylococcus aureus*……10
2) Un pathogène unique en son genre……11
   a) Phylogénie et généralités ……11
   b) Un pathogène ubiquitaire……13
      a. Portage……13
      b. Pathologies……14
   c) Les facteurs responsables de cette pathogénicité des staphylocoques dorés.16
      a. Les facteurs de virulence.……17
      b. Les mécanismes d'adaptation……24

II) Les moyens de lutte contre *S. aureus*……27

1) Les antibiotiques……27
   a) Les premiers antibiotiques……27
   b) Les résistances aux antibiotiques……30
2) Les limites des traitements actuels……33

III) La voie de synthèse des acides gras : FASII……39

1) Les rôles des acides gras……39
2) La membrane cellulaire……46
3) La synthèse des acides gras……48
   a) La voie FASII……48
   b) La régulation de la voie FASII……54
   c) Acquisition et utilisation des acides gras exogènes……57
4) Les stratégies d'inhibition de la synthèse des phospholipides……59

IV) Le contournement des anti-FASII……65

1) Mutation de la cible……65
2) Adaptation par la prise des acides gras exogènes……65
   a) Par mutation……65
   b) Sans mutation……66
3) L'utilisation des anti-FASII est-elle compatible avec l'hôte ?……66

Résultats……..67

I) ***Staphylococcus aureus*** **résiste aux anti-FASII en présence d'acides gras exogènes……68**

1) En mutant le gène *fabD*……..68
   Article n° 1 : « Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials »

2) Sans mutation de la voie FASII**……**88
   Article n° 2 : « Host factors promote *Staphylococcus aureus* fatty acid outsourcing and FASII antibiotic adaptation »

II) Détermination des voies mises en œuvre pour l'utilisation des acides gras exogènes sans mutation de la voie FASII……130

1) **Article n° 3** en préparation : « Caractérisation des facteurs impliqués dans l'adaptation de *S. aureus* aux antibiotiques anti-FASII »

Discussion et perspectives……160

Annexes……164

1) Des souches cliniques présentent une auxotrophie pour les acides gras exogènes…165
   Revue « The *Staphylococcus aureus* FASII bypass escape route from FASII inhibitors»
2) Microscopie électronique……175
3) Résultats PACBIO……179

Matériel et méthode de l'annexe……181

Références……..185

Abréviations

ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ACP	Acyl Carrier Protein
BHI	Brain Heart Infusion
CAMPs	Cationic Antimicrobial peptides
CFU	Colony Forming Unit
CL	Cardiolipin
CoA	Coenzyme A
DAG	Diacyl-glycerol
DNA	Desoxyribonucleic acid
FA	Fatty Acid
FASII	Fatty Acid Synthesis II
FA-Tric	Fatty Acid Triclosan
Fig.	Figure
G3P	Glycerol-3-Phosphate
L-PG	Lysyl-Phosphatidylglycerol
LTA	Lipoteichoic Acid
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MRSA	Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*
MSSA	Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*
OD	Optical Density
PG	Phosphatidyl-glycerol
PI	Propidium Ionide
PSM	Phenol Soluble Modulin
RNA	Ribonucleic Acid
S	Serum
SCV	Small Colony Variants
SerFA-Tric	Serum-Fatty Acid-triclosan
Tric	Triclosan
Tab.	Tableau
WT	Wild Type

Synthèse bibliographique

I) *Staphylococcus aureus*

1) La découverte de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, mieux connu sous le nom de Staphylocoque doré est sans doute l'une des bactéries qui a fait couler le plus d'encre dans l'histoire de la microbiologie et de la santé mondiale. Elle est l'une des plus documentées à l'heure actuelle avec plus de 116 000 articles et revues scientifiques, et plus de 15 000 articles durant mes 3 années de thèse (1). Son histoire commence par son observation par Robert Koch (1843-1910), puis Louis Pasteur (1822-1895) et ses collaborateurs en 1880 (2). Cette bactérie fut d'abord observée sous forme « d'amas en grains » lors d'études sur les germes de maladies provenant de pus de furoncle et d'ostéomyélite des patients. Cette même année, le chirurgien écossais Sir Alexander Ogston (1844-1929) fut le premier à isoler ce microorganisme à partir de pus provenant de 88 abcès humains (3). Il présenta ses recherches lors du 9ème congrès chirurgical à Berlin la même année, et établit un rôle causal entre la bactérie et les infections ou encore les septicémies. Il introduit ainsi le terme « agent infectieux » suite à l'expérience d'injection de cette bactérie chez des cochons et souris sains. Ces injections ont permis la reproduction des abcès du même type que ceux originellement découverts chez les animaux infectés. Un an plus tard, en 1881 il appela cette bactérie *Staphylococcus aureus*. Son origine vient du grec, *staphyle* signifiant « grappe de raisin », et du latin *aureus* pour « doré » en raison de sa couleur dorée en culture (due à la présence de caroténoïdes).

Fig. 1 : ***Alexander Ogston (4)*** *(1844-1929) à gauche,* ***Louis Pasteur (5)*** *(1822-1895) au milieu, exemple de* ***culture de S. aureus*** *sur boîte de pétri en milieu TSA à droite (6), la croissance est rapide en milieu riche.*

2) Un pathogène unique en son genre

a) Phylogénie et généralités

D'un point de vue phylogénétique, *S. aureus* fait partie du phylum des Firmicutes qui regroupe les bactéries à Gram positif. Elle est dans la classe des Bacilles, de l'ordre des Bacillales, de la famille des Staphylococcaceae et du genre Staphylococcus qui regroupe 52 espèces et 28 sous espèces (7).

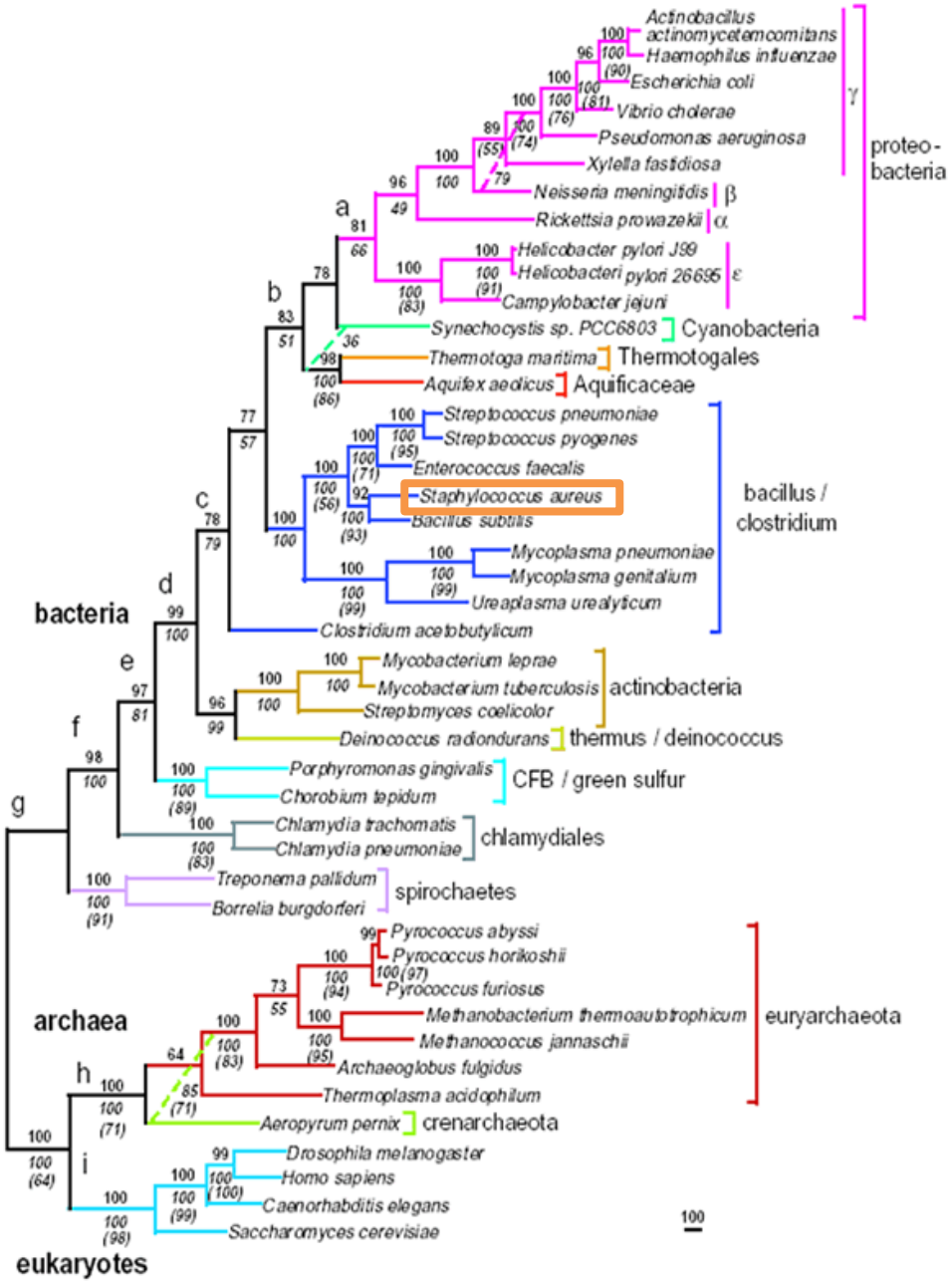


Fig. 2 : ***Phylogénie de Staphylococcus aureus*** *sur l'arbre de la vie, cette bactérie fait partie du phylum des Firmicutes qui regroupe les bactéries à Gram positif. Elle est dans la classe des Bacilles, de l'ordre des Bacillales, de la famille des Staphylococcaceae et du genre Staphylococcus (8).*

Forme des bactéries	Arrondies (coque)
Gram	Positive
Groupement	Regroupées en amas
Mobilité	Immobiles
Taille des bactéries (diamètre)	0,8 à 1 µm
Taille des colonies	1 à 3 mm
Forme des colonies	Arrondies, bombées opaques, dorées
Nombre et taille des chromosomes	1 chromosome 2,7 à 2,9 Mb
Nombre de gènes	2600 gènes dont 700 vitaux (9)
Plasmides	Nombreux (portage de résistance aux antibiotiques, transfert fréquent)
Contenu en G+C	Bas 30 à 39% suivant les souches
Acides aminés essentiels	Arginine, cystéine, proline, valine
Acides aminés non essentiels	Alanine, acide aspartique, histidine, isoleucine, lysine, sérine, thréonine, tryptophane
Sporulation	Ne sporulent pas
Catalase	Positif
Oxydative	Négative
Capsule	Oui
Respiration	Aéro-anaérobies facultatives
Température de culture	37°C mésophiles (croissance rapide, temps de division de 20 min à 37°C), croissance possible de 10 à 45°C (2)

Tab 1 : ***Résumé des caractéristiques physiologiques de S. aureus.***

Les isolats de *S. aureus* montrent de grandes variabilités. Cette variabilité associée à de nombreux facteurs de virulence et d'une bonne capacité d'acquisition de l'information génétique permet à cette bactérie de s'adapter à de nombreuses niches qui seront détaillées par la suite.

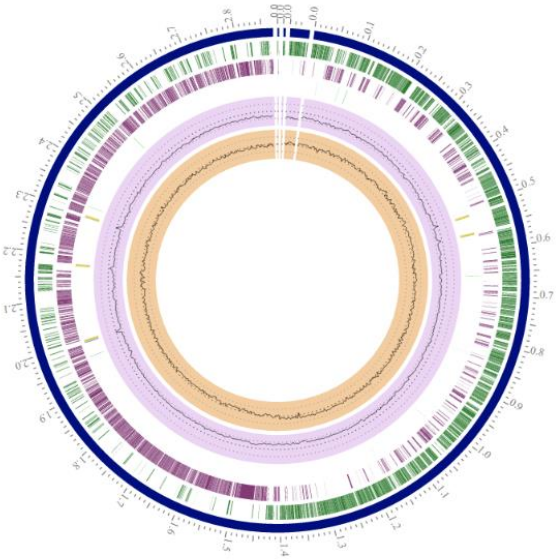


Fig. 3 : ***Exemple de génome de Staphylococcus aureus.*** *La souche FPR3757 (isolat de l'espèce USA300, un MRSA ou methicillin resistant S. aureus) est ici représentée en bleu pour le contig, en vert les CDS forward, en violet les CDS reverse, en rose le contenu en GC et en orange le GC skew (10).*

b) Un pathogène ubiquitaire

a. Portage

Le staphylocoque doré est la bactérie la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. En effet cette bactérie est la première cause d'infections nosocomiales (infections qui représentent 6 à 7 % des hospitalisations en France), et environ 20 % des septicémies contractées en milieu hospitalier (11). En France, elle est également retrouvée au 2ème rang (12) des bactéries responsables d'intoxications alimentaires du fait des toxines qu'elle peut libérer (2).

Malgré l'importance de *S. aureus* en tant que pathogène (13), cette bactérie appartient à la flore commensale de l'Homme (ensemble du microbiote présent dès la naissance et se trouvant sur la peau et une grande partie des muqueuses). Il est estimé que 30 % de la population est concernée par un portage nasal (voir Fig. 4). De plus, 60 % des individus (14) seraient colonisés de façon intermittente au cours de leur vie. Le principal site de portage est la cavité naso-pharyngée, mais la colonisation peut atteindre la peau, le périnée, le tractus digestif ou encore la gorge (15). Cette bactérie est aussi retrouvée dans certains aliments causant des toxi-intoxications.

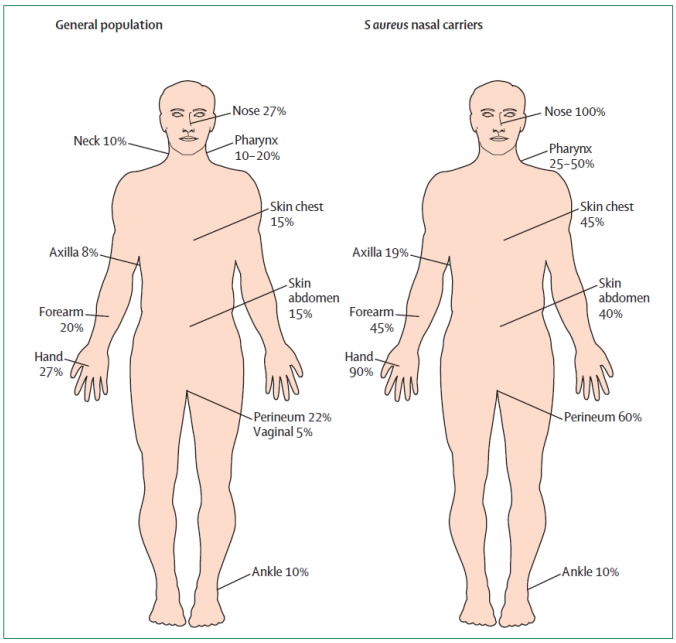


Fig. 4 : ***Portage de Staphylococcus aureus*** *chez l'homme (16). Cette bactérie est présente sur la quasi-totalité de la surface de la peau, mais on la retrouve principalement au niveau de la cavité nasale et des mains. Chez les porteurs sains, la présence de la bactérie est beaucoup plus généralisée favorisant le risque de pathologie.*

Staphylococcus aureus est l'espèce de staphylocoque causant le plus de problèmes en pathologie. D'autres espèces colonisent l'homme, dont certaines peuvent provoquer des infections : *Staphylococcus capitis* est retrouvé dans le cuir chevelu (17), *Staphylococcus epidermidis* (le staphylocoque blanc) est retrouvé chez la quasi-totalité des hommes (17) (sur la peau),

Staphylococcus auricularis est présent au niveau des conduits auditifs externes (18), et enfin *Staphylococcus lugdunensis* qui est présent dans la cavité nasale et produit un antibiotique la lugdunine (19).

b. Pathologies

Chez un porteur sain, *S. aureus* va pouvoir se développer au niveau d'une lésion et ainsi provoquer une infection cutanée. Comme pour la plupart des infections, la gravité varie selon la souche et l'état du patient, ainsi que l'efficacité du traitement. La prolifération bactérienne conduit généralement à des infections dites suppuratives (production de pus) qui sont présentes dans des furoncles, folliculites ou encore les panaris. Les infections des muqueuses, comme les otites, conjonctivites, endométrites, salpingistes, pneumonies et pleurésies sont aussi fréquentes. Les souches produisant des toxines (les exfoliatines A et B) peuvent provoquer des syndromes de « peau ébouillantée » chez les enfants en bas âge, ou encore l'impétigo bulleux (20). Le plus souvent les infections superficielles de la peau sont résolues par l'hôte. Malgré cela, elles ne sont pas à négliger car une diffusion hématogène peut produire des sites septiques secondaires. Ces infections cutanées représentent environ 90% des infections au staphylocoque doré (14).

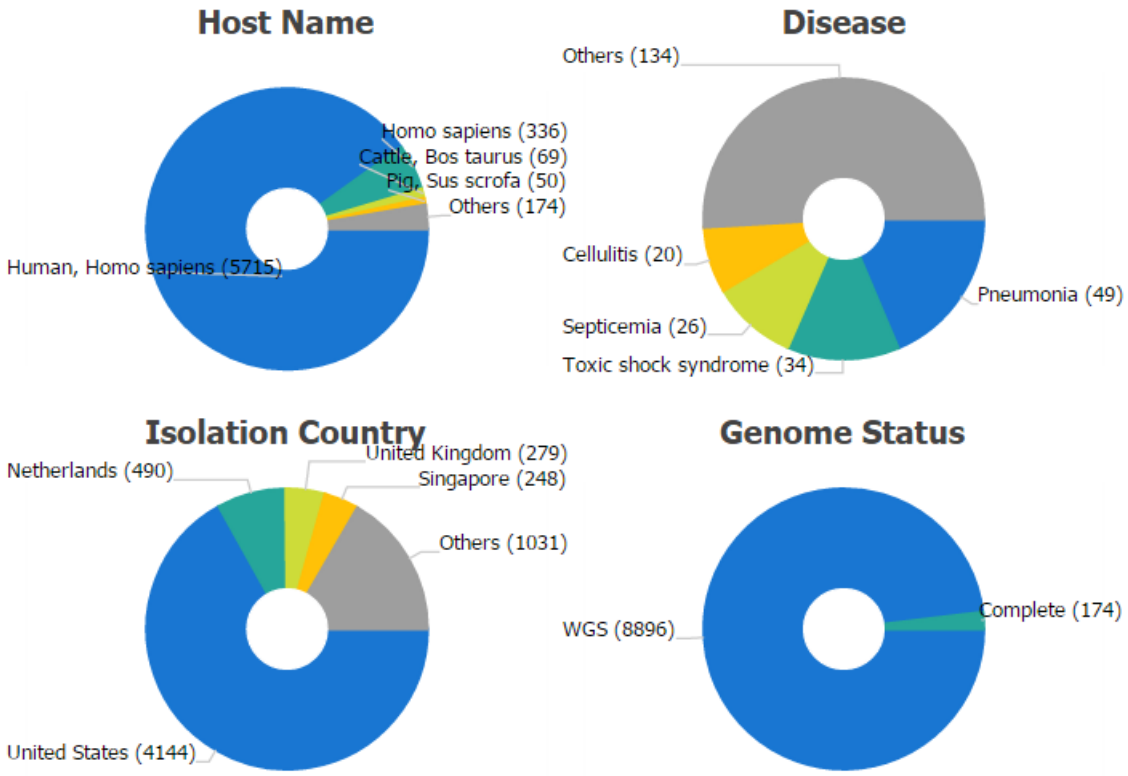


*Fig. 5 : Ce schéma résume les principaux **hôtes porteurs** de Staphylococcus aureus, les principales **infections** dont cette bactérie est responsable, et les **pays où les souches ont pu être isolées.** De plus, de **nombreux génomes** sont maintenant séquencés (10).*

Lors d'une blessure importante, d'une intervention chirurgicale ou d'une faiblesse du système immunitaire, une contamination interne peut avoir lieu. Le plus souvent, les patients sont infectés par leur propre flore (21). A ce moment-là, les bactéries deviennent pathogènes et vont pouvoir se développer. Le personnel hospitalier intervient également dans le transfert de souches entre patients (22). L'infection peut atteindre les os (ostéomyélite), le cœur (endocardite), les poumons (pneumopathie) ou encore les reins (pyélonéphrite).

Des toxines produites par *S. aureus* contribuent à la gravité de l'infection : l'expression de la toxine Panton-Valentine, connue depuis les années 30, permet la formation de pores chez les neutrophiles (23) et peut être responsable de pneumopathies nécrosantes (24). La toxine TSST-1 a été caractérisée lors de nombreux cas mortels du « choc toxique » associé à l'utilisation des tampons dans les années 80 (25). Les différents facteurs de virulence sont décrits plus en détail dans la prochaine partie.

Staphylococcus aureus produit une coagulase, ce qui permet la fixation au fibrin ; cette production est caractéristique de l'espèce. Les Staphylocoques coagulase-négatifs peuvent provoquer des infections dans certaines conditions, mais sont généralement associés avec un hôte immunodéficient ou porteur de prothèse. Par exemple, le *Staphylococcus epidermidis*, le « staphylocoque blanc » est commensale de l'homme et fait partie de la flore muqueuse de la quasi-totalité de la population, mais est responsable des infections mentionnées ci-dessus. Chez les femmes *Staphylococcus saprophyticus* est la seconde source d'infections urinaires du fait de sa présence préférentielle au niveau et la zone périnéale (26).

Des maladies dues aux staphylocoques n'impliquent pas toujours la présence de la bactérie. En effet, les intoxications alimentaires sont dues à la présence d'entérotoxines dans les aliments produites par la bactérie. En étant thermostables, les entérotoxines résistent à la stérilisation et provoquent des vomissements ou des diarrhées en quelques heures après ingestion. Sans gravité majeure, ce genre d'intoxication est pourtant rarement oubliée des patients.

S. aureus appartient à la flore commensale normale des animaux à sang chaud, principalement les mammifères (terrestres et marins) ainsi que les oiseaux. Elle est responsable de mammites chez les vaches, les brebis ou encore les chèvres. Les chiens sont atteints par les *Staphylococcus intermedius,* et les porcs par *Staphylococcus hyicus*. Ces souches n'infectent généralement pas les humains, sauf cas rares de morsures par un chien pour *S. intermeidius* ou par contact récurrent avec des élevages porcins pour *S. hyicus* (2).

c) Les facteurs responsables de la pathogénicité des staphylocoques dorés

S. aureus, comme toutes les bactéries à gram positif, possède une paroi composée d'une épaisse couche de peptidoglycane (PG) qui se situe du côté extérieur de la membrane. Deux grandes classes de molécules, les acides lipotéichoiques (LTA) et les acides teichoiques (WTA, pour « wall teichoic acids) participent à la stabilité et les fonctions du PG (voir Fig. 6). Les LTAs sont ancrés dans la membrane cellulaire. Ils sont composés de glycérolphosphates pour former de longues chaînes. Les WTA sont des polyols liés entre eux par des liaisons au PG. Ils sont composés de glycérolphosphates et de ribitolphosphates. Les LTA et les WTA sont impliqués dans le contrôle de la rigidité et de la porosité de la paroi, et donc dans, la morphologie bactérienne, la division cellulaire, l'homéostasie cationique et la protection contre les peptides antimicrobiens. De par ces activités, ces molécules sont aussi impliquées dans la formation de biofilms et de liaisons avec les bactériophages dont les sucres des LTA en sont les récepteurs (27-31).

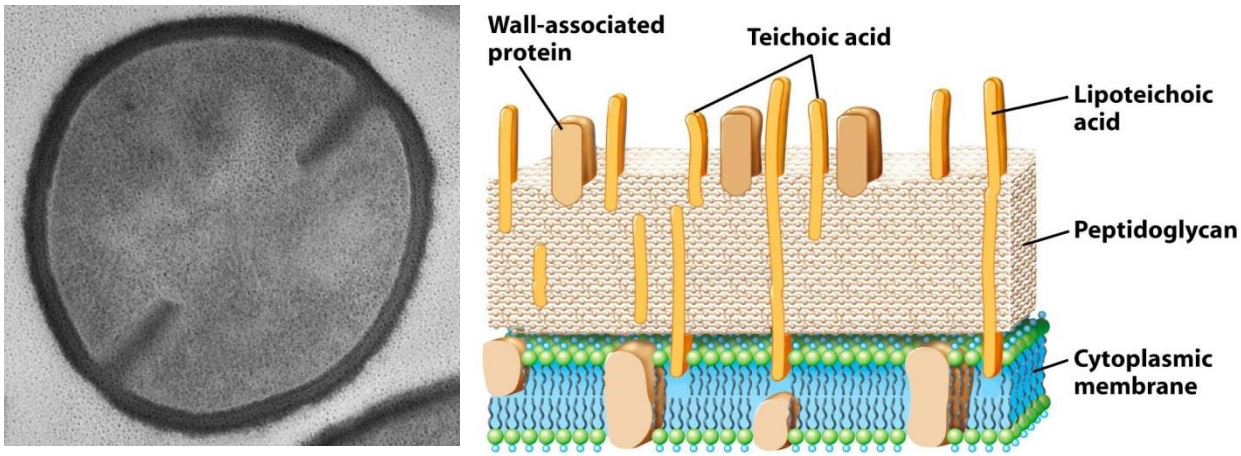


Fig. 6 : ***Staphylococcus aureus visualisé en microscopie électronique.*** *Culture de la souche JE2 réalisée en milieu riche BHI ici à* Do_{600nm} *= 1. La cellule visualisée commence à se diviser (32). La paroi est bien visible en noir, elle entoure la bactérie et lui permet d'avoir sa forme arrondie.* ***Schéma de la membrane et de la paroi cellulaire*** *des bactéries à Gram positif comme le staphylocoque doré (33). Les constituants de la paroi sont des peptidoglycanes, des acides lipotéichoïques, des acides teichoïque et des protéines.*

a. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence sont les armes que possède *S. aureus,* et qui lui confèrent sa palette variable des sites de colonisation et d'infection (voir Fig. 7). Les facteurs de virulences sont de 2 grands types. Ils vont jouer un rôle délétère actif contre l'hôte ou ils vont permettre à la bactérie d'être implantée chez l'hôte de manière plus passive. Il existe 4 classes de facteurs de virulence qui se distinguent par leur localisation bactérienne et leur mode d'action. Ils sont soit sécrétés, soit liés à la paroi. Leurs rôles sont de faciliter l'échappement au système immunitaire, ou de permettre la persistance (14).

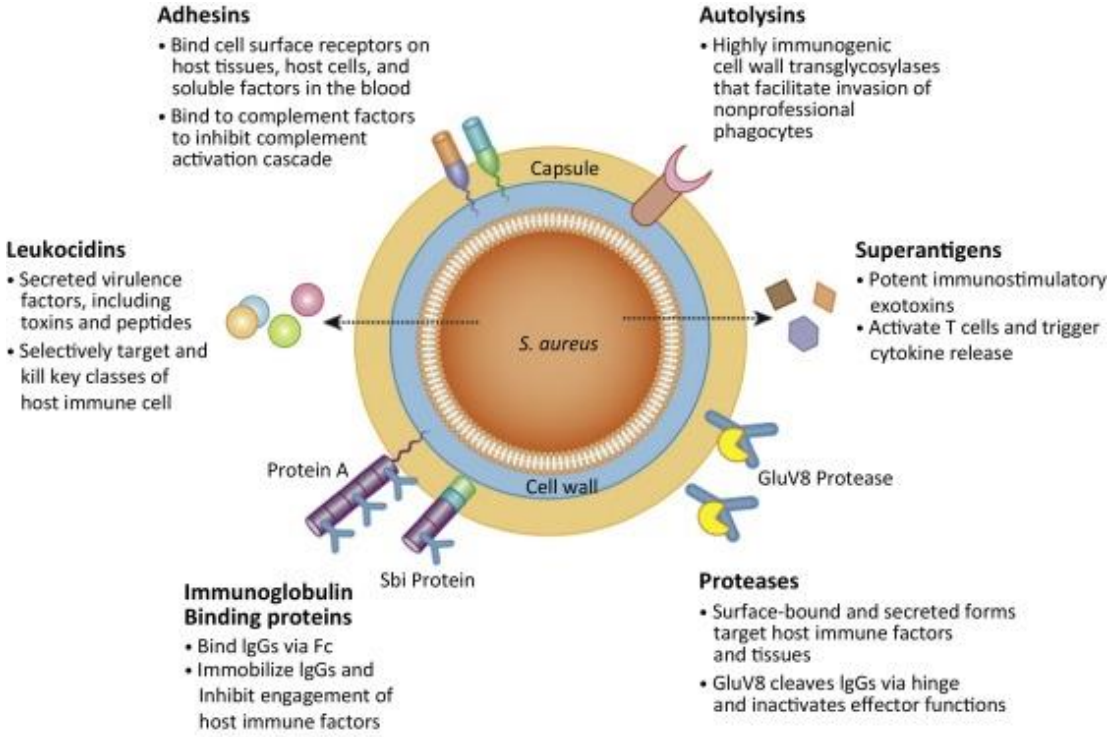


Fig. 7 : ***Les facteurs de virulences chez Staphylococcus aureus.*** *Les fonctions des différents facteurs connues à ce jour sont résumées sur cette figure* (34).

Cette multitude de facteurs de virulence est régulée au cours de la croissance par un réseau complexe de régulateurs, le mieux connu et le principal est appelé Agr pour *accessory gene regulator*.

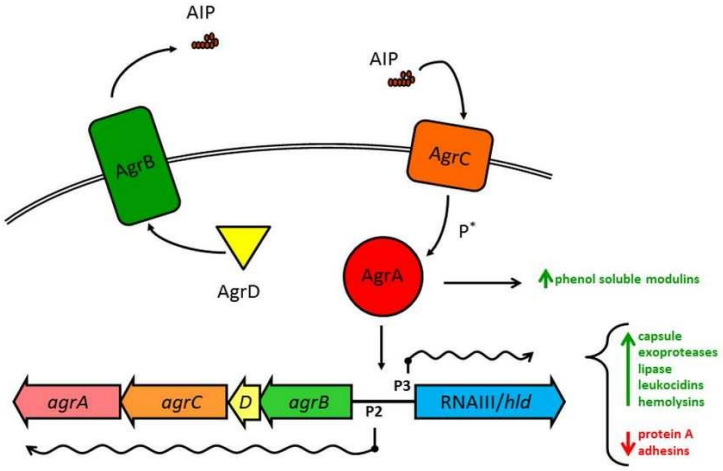


Fig. 8 : ***Structure de l'opéron agr chez S. aureus (35).*** *Le système agr est composé de 4 unités. La régulation de l'ARNIII*

se fait par le promoteur P3 et la sous unité AgrA. Cette régulation est associée à AgrC, qui est lui-même lié à AgrD et AgrB par l'AIP.

Un petit ARN nommé ARNIII module l'expression des facteurs de virulence : lors de la phase exponentielle, les facteurs d'adhésion sont exprimés, et les exoprotéines sont réprimées. En revanche, l'AIP « autoinducing peptide » produite par le RNAIII s'accumule en phase post-exponentielle, ce qui induit l'expression des exoprotéines. La régulation de ces facteurs est donc liée à la densité bactérienne dans le milieu.

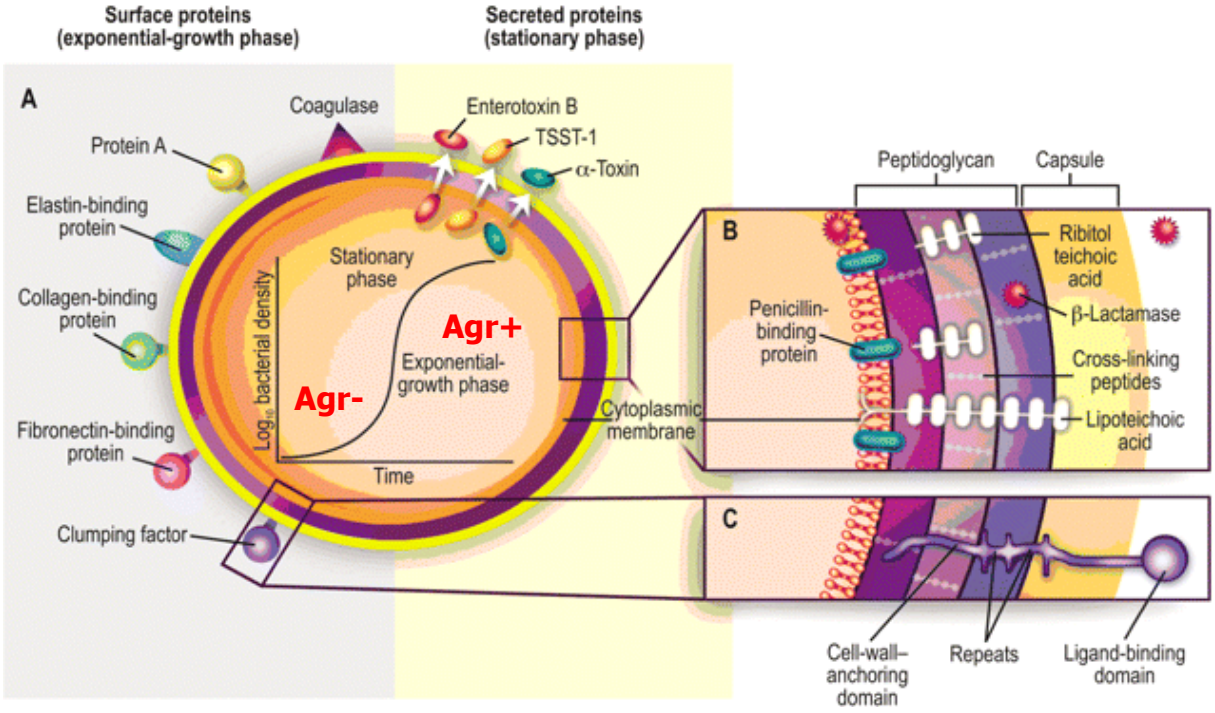


Fig. 9 : ***Agr régule de nombreux facteurs de virulence****. La régulation est fonction de la phase de croissance; la synthèse des différents facteurs de virulence est réalisée au cours de la phase post-exponentielle (36).*

Le processus d'infection nécessite une étape de fixation de la bactérie aux tissus de l'hôte. Les molécules permettant l'adhésion aux cellules de l'hôte sont donc parmi les premiers facteurs exprimés par *S. aureus* et rendent ainsi possible sa colonisation (Fig. 10).

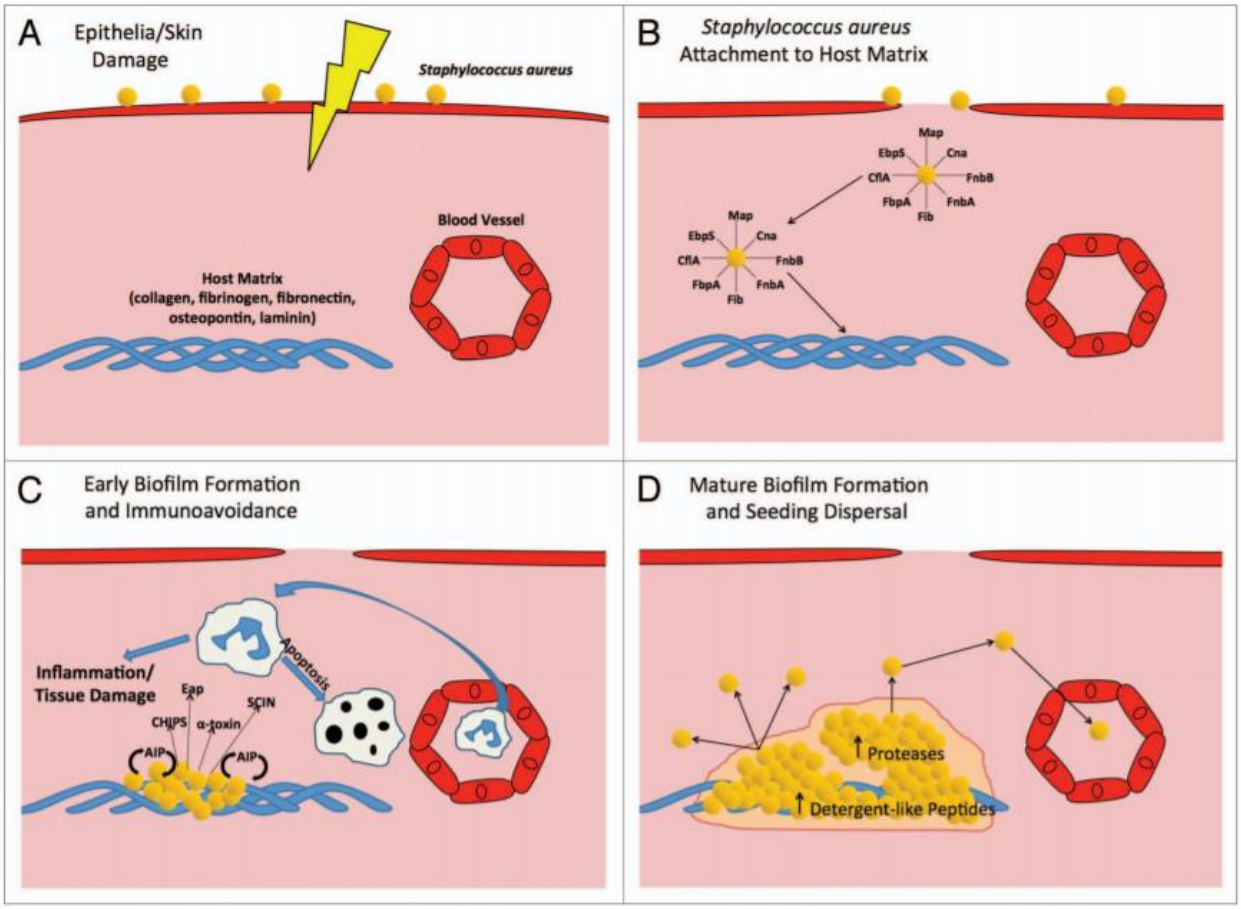


Fig. 10 : ***Les différentes étapes de l'invasion de l'hôte par S. aureus.*** *Suite à une lésion le pathogène va pouvoir passer la barrière épithéliale et va ensuite se fixer à la matrice de l'hôte. La bactérie va par la suite former un biofilm afin de se protéger du système immunitaire, et va organiser sa multiplication et finir par infecter le système sanguin (37).*

Les facteurs de virulence sont nombreux et peuvent être classés de la manière suivante.

- **Les facteurs de virulence retrouvés dans la paroi et la capsule**

Les molécules au niveau de la paroi sont appelées **MSCRAMMs** pour « *Microbial Surface Components Reconizing Adhesive Matrix Molecules* ».

Les MSCRAMMs sont les protéines ancrées à la paroi. Il en existe une vingtaine et la plus connue est la **protéine A** (codée par le gène *spA*) qui est la protéine de surface jouant un rôle important chez *S. aureus* (Fig. 11). Elle est ancrée dans la paroi, et relâchée durant la croissance sous forme libre (38). Elle lie les domaines Fc des immunoglobulines (Ig) humains et des souris (39), ainsi que les domaines Fab V_H3 des IgG et IgM (40). La protéine A peut se lier au facteur de Willebrand (vWf) qui est une glycoprotéine multimérique présente au niveau du sous-endothélium. Cette fixation permet à *S. aureus* d'adhérer partout où il y a une brèche de l'endothélium. La protéine A est donc un facteur primordial à l'établissement des infections endovasculaires (41).

Un autre facteur de virulence est la **capsule**, qui est codée par de nombreux pathogènes et la quasi-totalité des isolats de *S. aureus*. Elle est composée d'exopolysaccharides qui recouvrent la surface cellulaire et les molécules comme les antigènes. La capsule empêche ainsi l'opsonisation par les neutrophiles (42).

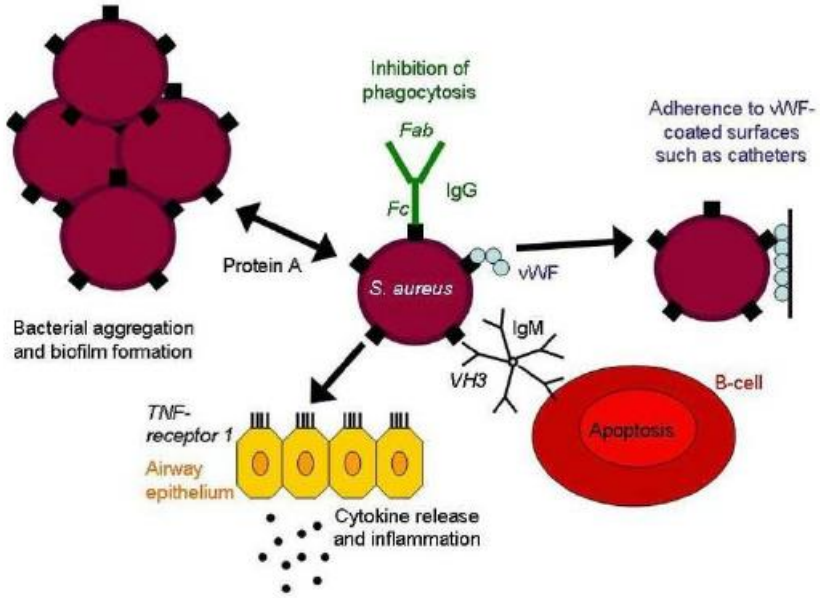


Fig. 11 : ***La protéine A.*** *Ce facteur de virulence est responsable de nombreux effets. Il permet d'adhérer à certaines surfaces et d'inhiber la phagocytose et l'apoptose. Il aide à la formation de biofilms, ou encore favorise l'inflammation des poumons par liaison au récepteur TNFR-1 (tumor necrosis factor 1) (43).*

Les MSCRAMMs sont associées au peptidoglycane. Elles permettent de se fixer au collagène, au fibrinogène et à la fibronectine. Elles servent donc à la première étape de la colonisation (44). Les protéines FnBP A et B (pour fibronectin binding protein A et B) permettent la liaison à la fibronectine qui est une protéine de la matrice extracellulaire. La protéine de liaison à la fibronectine permet aussi de se lier aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang, et joue un rôle dans l'internalisation par les cellules endothéliales. Ceci permet de rejoindre le système vasculaire, afin de se disséminer et ainsi provoquer une infection systémique. La protéine de liaison au fibrinogène est composée de facteurs dits clumping factor : ClfA et ClfB (impliqués dans la colonisation nasale) qui permettent l'agrégation des bactéries en présence de plasma. Enfin, la protéine de liaison au collagène Cna pour *collagen binding protein* est un facteur d'adhésion au collagène qui permet le maintien de l'infection (45), et qui serait responsable d'arthrites septiques (46) et d'ostéomyélites (47).

Parmi les facteurs de virulence retrouvés à la surface cellulaire, certains sont sécrétés et sont appelés les **SERAMs** pour *secretable expanded repertoir adhesive molecules.*

Le premier type de SERAMs rassemble les protéines Eap pour *extracellular adherence protein.* Elles ont pour particularité de se lier aux protéines du plasma (fibrinogène, fibronectine, prothrombine et vitronectine), ainsi qu'aux fibroblastes et aux cellules épithéliales. Cette fixation permet l'internalisation, et masque les récepteurs des leucocytes, ce qui limite leur recrutement.

Les Efb pour *extracellular fibrinogen binding protein* se lient au fibrinogène des plaquettes et permettent ainsi leur agrégation (48,49). Les SERAMs rassemblent aussi les EmP pour *extracellular matrix binding protein*.

La **coagulase** fait partie des SERAMs et transforme le fibrinogène présent dans le sang en fibrine (après association avec la prothrombine pour former la staphylothrombine), créant ainsi un caillot sanguin qui délimite le foyer infectieux et permet à la bactérie d'être à l'abri du système immunitaire. Cette bactérie peut même survivre dans des cellules du système immunitaire (50). A l'inverse *S. aureus* peut produire la staphylokinase, codée par un bactériophage qui a un rôle opposé à celui de la coagulase. Elle permet ainsi de libérer les bactéries (après multiplication au sein du caillot) afin de se disséminer dans l'hôte. Cette enzyme permet la conversion du plasminogène en plasmine et peut aussi cliver la fibrine, l'élastine et le collagène (51).

- **Les toxines**

S. aureus sécrète de nombreuses toxines : des exotoxines, des toxines superantigéniques, des exfoliatines et des PSM (Fig. 12) pour *Phenol Soluble Modulin* qui sont des petits peptides (44 ou 21 acides aminés) sécrétés sans peptide signal et possédant une activité cytolytique contre les neutrophiles. Ces toxines vont permettre de répandre l'infection.

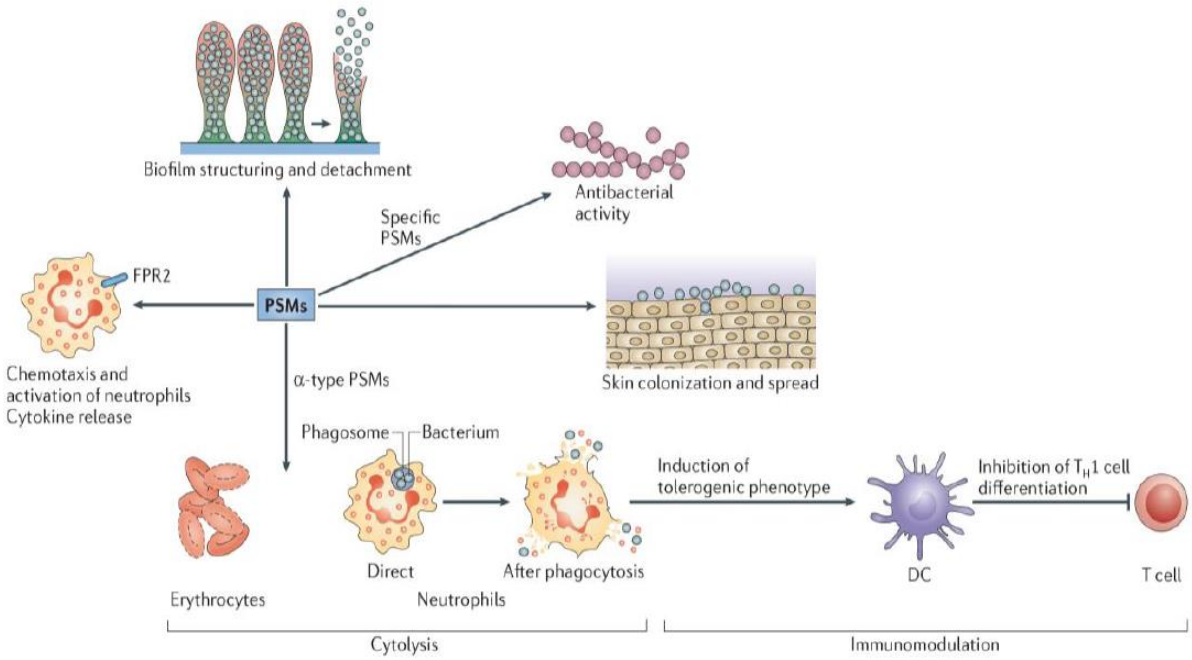


Fig. 12 : ***Les actions biologiques des PSM.*** *Les PSM provoquent une structuration et un détachement du biofilm, une propagation cellulaire sur les surfaces ou une cytolyse. Certains PSM peuvent être antimicrobiens (en particulier vis-à-vis des streptocoques). La lyse des neutrophiles par les PSM de type α peut se produire après la phagocytose, ce qui fait des PSM une arme particulièrement utile contre l'élimination par la défense innée de l'hôte. Les PSM affectent également le système immunitaire adaptatif en induisant un phénotype tolérogène dans les cellules dendritiques (DC) et en inhibant la différenciation Th1 dans les cellules T (52).*

Les entérotoxines, les exfoliatines A (ETA), B (ETB), D (ETD) et la TSST-1 sont des toxines. Les exfoliatines A et B sont codées par des gènes phagiques *eta* et *etb.* En revanche l'exfoliatine D est synthétisée par un gène présent dans un ilot de pathogénicité *etd* (53). Ces toxines produites par la majorité des souches de *S. aureus* agissent à distance, et ont une activité dite **superantigénique**. Il existe 23 superantigènes staphylococciques décrits à ce jour, portés pour la plupart par des éléments génétiques mobiles. Ces toxines sont régulées par le système Agr. Elles permettent une activation polyclonale des lymphocytes T, et provoquent une libération importante de cytokines. La TSST-1 est connue pour être responsable de chocs toxiques staphylococciques en provoquant une prolifération non spécifique de lymphocytes T. Les entérotoxines sont impliquées dans les intoxications alimentaires de par leur effet émétisant. Elles sont thermostables (donc peuvent résister au traitement alimentaire anti bactérien), et sont résistantes à la pepsine stomacale. Elles ne sont détruites ni par la cuisson de l'aliment, ni par l'acidité de l'estomac (54).

Parmi ces facteurs sécrétés, certains proviennent de **phages**. Il s'agit de facteurs de virulence spécialisés dans l'échappement du système immunitaire : les protéines SCIN pour *staphylococcal complement inhibitor* et CHIPS pour *chemotaxis inhibitory protein of S. aureus* sont portées par le phage Φ13. Les CHIPS sont codées par le gène *chp* et permettent l'évasion au système immunitaire. Elles bloquent le recrutement des neutrophiles et des monocytes, alors que les SCINS sont responsables de l'inhibition de la C3 convertase qui permet le clivage de C3 en C2a et C3b. Cela empêche le recrutement des neutrophiles au site d'infection, et donc empêche la phagocytose.

Les exotoxines forment des pores dans les membranes des cellules cibles. Par exemple, l'hémolysine α (codée par *hla)* est l'une des toxines les plus puissantes de *S. aureus*. Elle cible les cellules endothéliales, les monocytes, les thrombocytes et les érythrocytes. L'hémolysine β (*hlb*) est une sphingomyélinase qui altère les membranes des érythrocytes par action phospholipase. L'hémolysine ϒ (*hlg*) est responsable de la lyse des érythrocytes et des leucocytes, et enfin l'hémolysine Δ possède une action détergente et fait partie de la famille des PSMs.

Parmi les toxines, certaines ciblent particulièrement les membranes. Il s'agit de **cytotoxines** qui ont pour particularité de nécessiter deux composants. On peut citer la toxine (ou leucocidine) de Panton-Valentine (PVL) qui est portée par le phage ΦPVL présent dans 2% des souches. Elle cible les polynucléaires, les monocytes et les macrophages en créant des pores dans leur membrane. Cette leucotoxine est une toxine protéique à deux composants, une sous-unité de classe S et une de classe F qui sont capables de former des pores au niveau des cellules cibles. Il existe plusieurs sous-unités S et F. Elles peuvent former 5 leucocidines différentes, ayant chacune des spécificités cellulaires et d'espèces (55). Cette toxine joue un rôle dans les infections cutanées nécrosantes et certaines infections graves.

Toxine	Sous-unité S	Sous-unité F	Récepteur(s) de la sous-unité S	Cellules cibles
PVL	LukS-PVL	LukF-PVL	C5aR et le C5L2 (28)	Polynucléaires neutrophiles (PNN) et macrophages humains et de lapins. Très peu active sur les PNN murins.
Hlg A/B	HlgA	HlgB	Non identifié	Erythrocytes humains.
Hlc C/B	HlgC	HlgB	Non identifié	PNN humains et de lapins, érythrocytes de lapins.
Leucocidine Luk-ED	LukE	LukD	CCR5 (29)	Lymphocytes T, monocytes, macrophages et cellules dendritiques humaines.
			CXCR1 et CXCR2 (30)	PNN humains.
Leucocidine Luk-AB = Luk-HG	LukA(H)	LukB(G)	CD11b (31)	PNN humains.

Tab 2 : ***Les différentes leucocidines à deux composants retrouvées chez S. aureus et leurs cibles*** *(54,56-58).*

Une absence de certains facteurs de virulence peut favoriser le portage ou les infections longue durée. En effet, l'inhibition de la production de l'hémolysine β favoriserait le portage de ces souches, car ceci serait lié à une diminution de la virulence de la souche (59). La colonisation de l'hôte par *S. aureus* est un subtil mélange entre production et inhibition des facteurs de virulence favorisant ainsi une dispersion chez les hôtes.

b. Les mécanismes d'adaptation

S. aureus occupe de nombreuses niches chez l'hôte et dans la nature. Les mécanismes d'adaptation mis en œuvre par cette bactérie lui permettent une présence ubiquitaire aussi bien chez l'homme, que chez l'animal ou encore dans l'environnement (dont les aliments) (2). Ainsi, il n'est pas surprenant qu'il possède un éventail de mécanismes d'adaptation. C'est une bactérie halophile, qui tolère jusqu'à 20 % de NaCl (capacité partagée avec certains archeaes). Elle survit à des Aw faibles (moins de 0.93 jusqu'à 0.83 (60)). Ces capacités de survie pourraient expliquer son rôle dans des intoxications alimentaires, car *S. aureus* prolifère dans des milieux salés comme les charcuteries, généralement inhibiteurs de microorganismes. Ces capacités de survie lui permettent par exemple de résister à la dessiccation sur un morceau de coton stérile incubé à température et humidité ambiante pendant 3 mois (61).

S. aureus a plusieurs modes de vie, l'un d'entre eux est la forme de biofilm (62) (Fig. 13). Il est responsable d'infections chroniques, d'infections des implants et du matériel chirurgical, car leurs formations sont possibles sur des surfaces inertes ou vivantes. En effet, les biofilms constituent une alternative majeure au mode de vie par croissance « planctonique ». Les biofilms sont des formes que les bactéries utilisent pour se protéger de l'environnement afin de pouvoir se multiplier sans être gênées par l'hôte. La bactérie va essayer de s'accrocher sur une surface, et d'y rester. Les biofilms sont structurés par des polymères (principalement des polysaccharides) mais aussi des protéines, acides nucléiques et des lipides lui permettant d'échapper aux agressions extérieures. (63). Les bactéries ne sont ainsi plus accessibles ni par les cellules du système immunitaire, ni par les antibiotiques qui pénètrent difficilement les biofilms. De plus, elles sont à l'abri d'autres types de nuisance comme le courant (sang dans les artères par exemple). Ce type d'organisation est difficile à contrer, et de nombreuses études portent sur ce sujet. L'organisation de ces structures crée des gradients de nutriments, d'oxygène et de molécules de signalisation qui provoquent des hétérogénéités physiologiques et génétiques des bactéries au sein de ces biofilms (64). Selon des estimations de l'Institut National de la santé aux USA, les biofilms représentent 65 à 80% des infections microbiennes humaines (65).

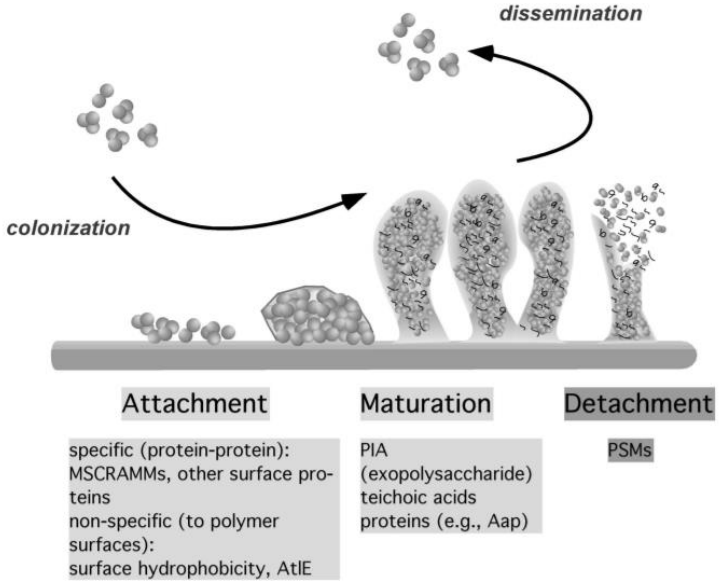


Fig. 13 : ***Le développement des biofilms chez les staphylocoques****: La première étape est l'attachement à la surface (biologique ou non). La seconde étape est la maturation : de nombreuses molécules sont utilisées par les bactéries pour communiquer et s'agglomérer entre elles. La dernière étape est le détachement des bactéries pour mieux coloniser l'hôte (66).*

L'adaptation de *S. aureus* est aussi due à une flexibilité génomique importante. Ce facteur conduit à la multi-résistance aux antibiotiques et constitue la raison majeure de la difficulté de traiter les infections. Cette problématique soulève un challenge médical et économique qui justifie un développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (67).

Les mutations peuvent donner lieu à des micro-colonies SCV (*Small Colony Variants)* (68), des cellules dormantes ou persistantes (69).

La comparaison des génomes de *S. aureus* a permis d'identifier un « core » qui représente environ 75% de son ADN et contient les gènes du métabolisme. Les autres 25 % comprennent des éléments mobiles, des plasmides intégrés, plasmides conjugatifs, des transposons, de l'ADN provenant de transfert horizontal, des prophages, et des ilots de pathogénicité. Ces derniers représentent plus de 750 régions variables (de plus de 20 pb) (2). En plus de ces gains d'ADN, une micro diversité de la population de *S. aureus* est notamment due aux mutations ponctuelles dans certaines conditions qui sont de l'ordre de 1%, et qui peuvent être responsables de changements métaboliques (2). Ce taux est très élevé. En effet, le taux de mutations spontanées chez les bactéries est de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-9} (70). Les souches mutatrices de *S. aureus* deviennent « hyper-recombinantes », ce qui favorise des remaniements d'ADN.

Chacun de ces facteurs contribue à la virulence et à l'acquisition des gènes qui confèrent la résistance aux antibiotiques (71). Parmi ces gènes responsables de virulence, nous pouvons par exemple citer la toxine PVL décrite précédemment et qui provient d'un phage. Concernant les résistances aux antibiotiques, nous pouvons noter que la résistance à la pénicilline vient d'un plasmide produisant une enzyme dégradant la pénicilline, appelée pénicillinase (72). La résistance

à la méthicilline, provient, elle du gène mecA basé sur un élément mobile appelé SCC *staphylococcal chromosoe cassette*. La résistance à la vancomycine (VRSA) est associée à la présence du transposon Tn1546 porté par un plasmide issu d'*Enterococcus faecalis* (73). L'acquisition des gènes explique donc en partie la multi-résistance aux antibiotiques pour lequel *S. aureus* est connu.

II) Les moyens de lutte contre *S. aureus*

1) Les antibiotiques

a) Les premiers antibiotiques

La découverte des antibiotiques par Sir Alexander Fleming (1881-1955) au St Mary Hospital de Londres fut un heureux hasard en 1928. C'est lors de l'étude de sa première grande découverte, le lysozyme en 1922, en utilisant des staphylocoques sur boîte de petri qu'il découvre qu'une boîte contenait un contaminant d'une colonie inhabituelle de moisissure. Fleming a aperçu une zone d'inhibition autour de la moisissure où les staphylocoques ne s'étaient pas développés. Il a alors émis l'hypothèse que le champignon a produit une substance qui empêche les bactéries de se développer. En effet, la découverte a été facilitée par la présence de son voisin de paillasse, le mycologue Charles J. Latouche, qui a pu cultiver le champignon *Penicillium notatum* (Fig. 14). Ce champignon donna le nom à cette substance, la « pénicilline ». Cette découverte du premier antibiotique fut publiée dans le journal *British Journal of Experimental Pathology* en 1929 sans attirer l'attention. Fleming décida toutefois de continuer ses recherches, et montra que la pénicilline n'était pas toxique pour l'animal, aussi bien en usage antiseptique cutané que par injection. La difficulté de production de cette molécule et le manque d'attention médiatique et scientifique, ont fini par lui faire abandonner ses recherches. Les sulfamides découverts en 1935 vont faire encore plus d'ombre à cette 1ère découverte. Ce n'est qu'en 1939, dix ans plus tard, que les travaux seront repris par Howard Florey (1898-1968) et Ernst Chain (1906-1979) (Fig. 14), et mèneront à la purification de la pénicilline en quantité industrielle. La découverte et la production de ce premier antibiotique ont été récompensées en 1945 par un Prix Nobel pour les trois chercheurs.

Fig. 14 : ***Alexander Fleming*** *(74) (1881-1955),* ***Erns Boris Chain*** *(75),* ***Sir Howard Walter Florey*** *(76), les 3 prix Nobel de physiologie ou de médecine en 1945 honorent la découverte de la pénicilline. A droite,* ***une boîte de pétri contenant le champignon penicillium et du staphylocoque*** *montre une zone claire d'inhibition dont la pénicilline est responsable (77).*

L'histoire des premiers antibiotiques est bien connue et cache une découverte plus ancienne et importante. Un autre moyen de lutter contre les bactéries est l'utilisation de virus « tueur » de bactéries. La primauté de cette découverte est souvent liée aux noms de l'anglais Frédéric Twort (1877-1950) et le Franco-Canadien Félix d'Hérelle (1873-1949), mais il est estimé que le britannique Hanbury Hankin (1865-1939) serait le premier à avoir annoncé la présence d'un agent bactéricide présent dans l'eau en 1896 (78). Son travail au sein d'un laboratoire gouvernemental en Inde lui a permis d'observer une destruction rapide de bacilles en culture lorsqu'ils sont en contact avec l'eau

des fleuves Gange et Jumna. Il démontra que cet agent est détruit par la chaleur (autoclavage), et possède une petite taille lui permettant de passer au travers d'un filtre Chamberland (filtre en porcelaine créé afin d'assainir l'eau de Paris en ne laissant pas passer les bactéries). Hankin propose l'existence d'une substance chimique volatile pour expliquer ces observations. Sans pouvoir mieux appréhender ce phénomène, il montra néanmoins l'existence d'un agent antibactérien naturel présent dans la même eau où des pathogènes peuvent être retrouvés. En 1915, Twort est le second à décrire la présence de zones « vitreuses » au sein des tapis des microcoques du genre *S. aureus* (Fig. 15). Il appela ce phénomène « plage de lyse ». Il montra par ce procédé que cet agent ne se développe plus lorsque les bactéries sont tuées.

C'est d'Hérelle (Fig. 15), travaillant à l'Institut Pasteur de Paris qui, en 1917, a été le premier à formuler l'existence de « microbes invisibles » qui infectent et tuent des bactéries provenant des patients. C'est pendant la 1ère guerre mondiale qu'il fut appelé afin d'étudier une épidémie de dysenterie touchant des soldats français. L'étude des selles des soldats en voie de guérison montre, dans le filtrat, la présence d'un agent invisible antagoniste des bactéries sur les cultures d'agar. Suite à ses expérimentations, il nota que la multiplication de ces virus nécessite des cellules vivantes et la lyse des bactéries. Ce phénomène s'effectuerait en « vagues » qu'il énonça comme des cycles d'infection. Il nomma ces virus « bactériophages », plus communément appelés aujourd'hui phages. Leur nom vient du grec ''phagein'' qui signifie dévorer.

D'Herelle a été le premier à vouloir utiliser ces bactériophages à des fins thérapeutiques pour lutter contre les dysenteries bacillaires provoquées par Shigella. Ainsi naquit la phagothérapie. C'est lors d'une importante épidémie de choléra chez les poules en 1919 qu'il réussit à utiliser les bactériophages comme antimicrobiens. Il teste le transfert chez l'Homme (sur lui-même et sa famille) afin de vérifier l'innocuité de sa solution en ingérant des doses croissantes de bactériophages contre Shigella.

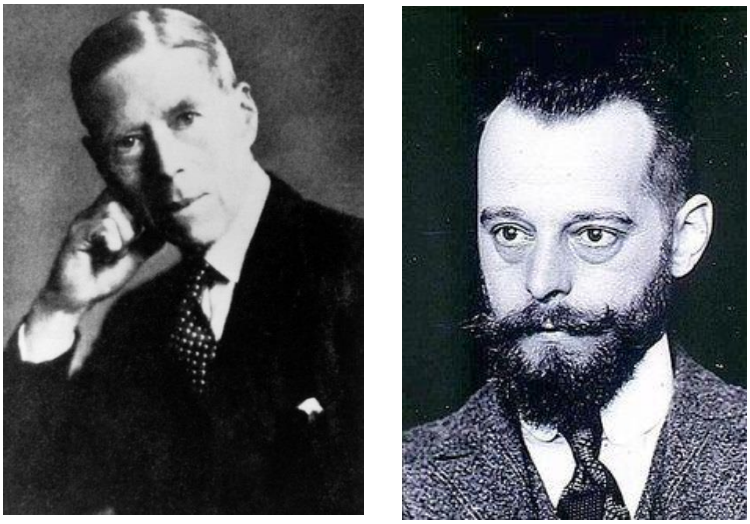


Fig. 15 : ***Frédéric Twort*** *(79) (1877-1950) à gauche est le premier à décrire les plages de lyses, à droite* ***Félix D'Hérelle*** *(80) (1873-1949) est le premier scientifique à avoir mentionné l'existence de « microbes invisibles » tuant des bactéries.*

Fort de ces résultats, d'Hérelle a pratiqué l'administration humaine pour la première fois en 1921 chez des patients dysentériques à l'hôpital des enfants-malades de Paris (81,82). Suivront en 1925 des patients atteints de peste bubonique en Egypte. L'efficacité de ce traitement l'a mené en Inde en 1926 pour juguler une épidémie de choléra (83) (84).

Par la suite, d'autres expériences, notamment contre *S. aureus* ont permis les premières commercialisations au niveau mondial. D'Hérelle a créé le « laboratoire du bactériophage » à Paris afin d'en commercialiser différents cocktails. Il travailla ensuite à Tbilissi en Géorgie avec Georges Eliava, qui après un passage à l'Institut Pasteur, fonda l' « Eliava Institute of bacteriophage, Microbiology and Virology » en 1923 (85). C'est le début de l'âge d'or de la phagothérapie qui se répand à travers le monde dans les années 1930.

Les centres de recherches comme l'Institut Eliava en Géorgie ont permis la généralisation en Géorgie de la phagothérapie qui est toujours utilisée avec succès de nos jours. Malgré ces résultats, le microbiologiste belge Jules Bordet (1870-1961), prix Nobel de physiologie et de médecine en 1919 émet l'hypothèse d'un phénomène enzymatique et non viral. Cette controverse prit fin dans les années 40 avec les premières observations au microscope électronique par H. Ruska (86). L'arrivée massive des antibiotiques dans les années 1940 a fortement diminué l'intérêt de telles thérapies, laissant ces travaux aux pays de l'Europe de l'Est qui avaient peu accès aux antibiotiques du fait du contexte géopolitique d'après-guerre.

Les phages sont aujourd'hui connus comme des entités biologiques (les plus) simples qui sont capables de diriger leur réplication. Ils sont les plus abondants de la biosphère (87,88), et l'on considère que toutes les espèces bactériennes peuvent être la proie de plusieurs espèces phagiques.

L'essor des antibiotiques a mis de l'ombre au développement des phages, (jusqu'à la destruction de collections de bactériophages dans les années 80, notamment à l'Institut Pasteur (81)). Il est intéressant de noter le retour de la phagothérapie dans les pays occidentaux du fait de l'émergence de bactéries multirésistantes depuis les années 2000. Le désagrément des phages lié à l'utilisation d'une souche phagique pour une souche bactérienne face aux antibiotiques à spectre large, est maintenant devenu un atout dans l'optique de thérapies ciblées sauvegardant le microbiote humain.

L'essor de l'antibiothérapie se fera durant la seconde guerre mondiale et a conduit à l'apparition d'une trentaine de nouvelles molécules. Les résultats de leur utilisation ont conforté la position que « le temps est venu de fermer le livre des maladies infectieuses » d'après W. Stewart (10ème chirurgien général des Etats-Unis, équivalent du directeur général de la santé en France) en 1969 (81).

b) Les résistances aux antibiotiques

La résistance accrue des bactéries, et notamment de *S. aureus*, aux antibiotiques est à l'origine d'un problème sanitaire mondial. Les premiers traitements antibiotiques contre une septicémie due au *S. aureus* sont bien entendus composés de pénicilline en 1941. Rapidement, Fleming se doute que des résistances aux antibiotiques pourraient avoir lieu tôt ou tard. « Au lieu d'éliminer l'infection, le risque serait que les microbes apprennent à résister à la pénicilline, et que ces mêmes microbes soient ensuite transmis d'un individu à l'autre et provoquent une infection que la pénicilline ne pourra guérir » (89).

En effet, l'utilisation des antibiotiques à grande échelle a entrainé d'inévitables résistances. Les premières souches résistantes à la pénicilline ont rapidement donné raison à la prédiction de Fleming ; elles sont apparues en 1947, après la découverte par Kirby en 1944 de penicillinase produite par des souches de *S. aureus* (90,91).

Ces souches résistantes furent cantonnées au milieu hospitalier, avant de se répandre dans 90% des isolats communautaires (92). La découverte de nouveaux antibiotiques se faisant rapidement à l'époque, la méticilline a permis de lutter contre les bactéries résistantes à la pénicilline dans les années 60. Comme la première fois, les résistances sont apparues, et en 1961 furent découverts les premiers microorganismes résistants au Royaume-Uni (93) (Fig. 16). Ces bactéries furent appelées MRSA, provenant de l'anglais « Methycilin resistant *Staphylococcus aureus* ».

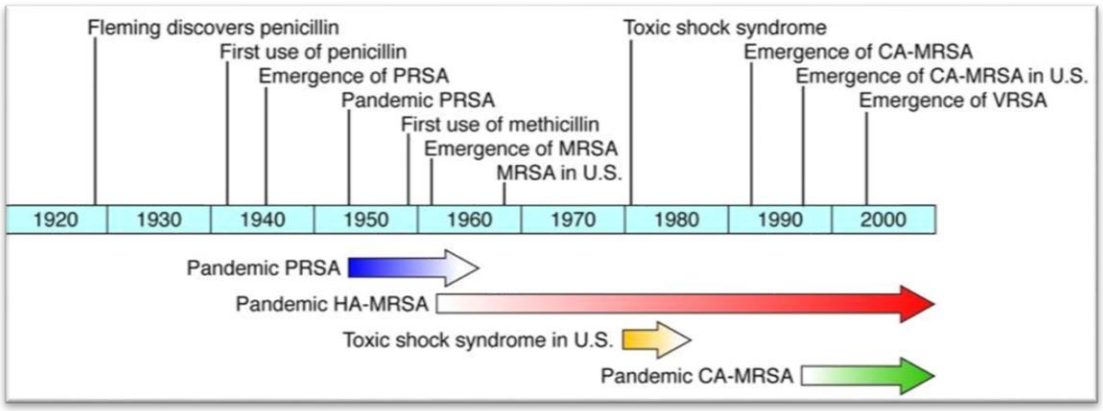


Fig. 16 : ***S. aureus développe rapidement des résistances aux antibiotiques****. Aujourd'hui, 90 à 95 % des souches sont résistantes à la pénicilline et 60 à 70 % sont résistantes à la méticilline. En 2002, deux cas de résistance vraie à la vancomycine ont été rapportés, à la fin de l'année 2013 leur nombre était de 13 (73) (94). Figure de DeLeo et al. (92).* A ce jour une vingtaine de souches sont résistantes à la vancomycine (VRSA) (95).

En avril 2014, le premier rapport mondial de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) sur la surveillance de la résistance aux antimicrobiens fut publié. Cette étude montre la situation mondiale du taux de résistance à la méticilline qui peut dépasser 80% dans certains pays (96) (Fig. 17). Tous les pays sont touchés, et l'expansion des résistances est inévitable (Fig. 19). Cette ampleur mondiale est responsable d'un surcoût économique qui se chiffre en dizaines de milliards d'euros

par an ainsi qu'un nombre important de décès (97).

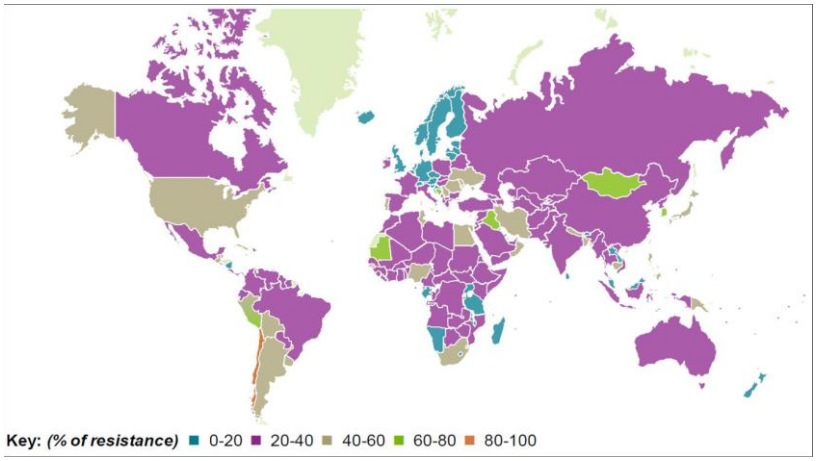


Fig. 17 : ***Taux de résistance à la méticilline par pays.*** *Cette carte montre une étendue importante de ce type de résistance à travers le monde ainsi que sa disparité. On note un taux qui peut dépasser les 80% en Amérique latine.*

En effet, malgré les progrès de la médecine moderne, la mortalité due à une bactériémie au *S. aureus* est encore de 20 à 30% dans les pays développés (98). Les difficultés de traitement et la gravité des infections entrainent des souffrances physiques et économiques, avec des frais supplémentaires d'hospitalisation estimés à 1.6 milliards d'euros en Europe en 2012 (99).

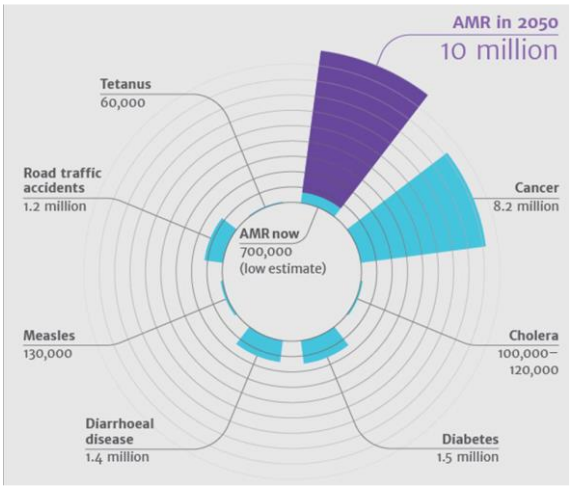


Fig. 18 : ***Morts attribuables aux résistances aux antibiotiques.*** *Comparaison des morts dues à la résistance aux antibiotiques dans le monde face aux autres causes médicales majeures de mort. En bleu clair les morts en 2013, en violet la projection pour 2050 (100).*

Le développement de nouveaux antibiotiques et leur mise sur le marché se sont considérablement ralentis, alors que la résistance aux antibiotiques actuels ne cesse d'augmenter. Si les moyens de lutte contre ce microorganisme s'amenuisent, certaines chirurgies de « confort » (remplacement d'articulations etc.) deviendront trop dangereuses eu égard au ratio bénéfices/risques pour être mises en œuvre.

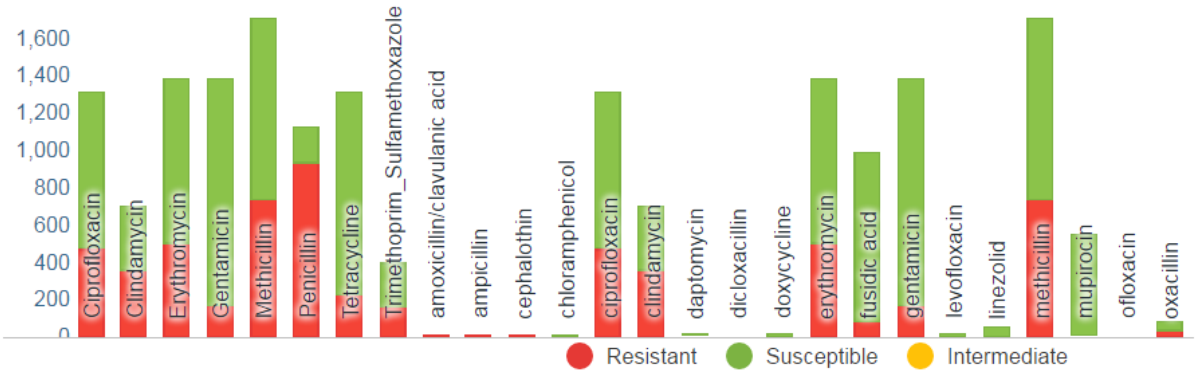


Fig. 19 : ***Nombre de souches résistances aux différents antibiotiques (10).*** *En rouge sont représentées les souches résistantes, en vert les souches sensibles et en jaune les souches intermédiaires aux différents antibiotiques. Parmis ces souches de plus en plus comportent des résistances à plusieurs types d'antibiotiques posant ainsi des problèmes croissant des infections provoquées par cette bactérie.*

Les prévisions de l'OMS sont sombres. Elles font ressortir qu'en 2050, toutes les 3 secondes une personne va mourir dans le monde à cause des résistances aux antibiotiques (Fig. 18). Partant de ce constat et des problématiques du suivi des résistances à travers le globe, l'OMS a lancé en 2016 un nouveau projet appelé GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System), dans le but de mieux suivre les souches résistantes. Une méthodologie identique à tous les pays participants va favoriser des études plus robustes. Les premiers résultats sont attendus dans l'année 2018 avec 20% des membres de l'OMS (le nombre de pays participant au projet est augmenté chaque année) (101). Par ailleurs, des initiatives dans les laboratoires sont lancées pour stimuler le développement de nouvelles cibles, des approches alternatives aux traitements, et des nouvelles molécules et/ou des approches combinatoires.

2) Les limites des traitements actuels

Il existe une multitude d'antibiotiques afin de lutter contre les bactéries. Ils agissent sur les cellules selon plusieurs catégories de cibles, tels que la membrane, la paroi et le cytosquelette bactérien. Ces éléments permettent de résister aux variations de pression osmotique. D'autres antibiotiques ciblent les voies de synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) ainsi que des protéines. Enfin, une autre stratégie est de bloquer les voies métaboliques dont les produits sont essentiels pour la cellule, comme la production d'acides gras dans notre cas (Fig. 20). La plupart des classes d'antibiotiques ont une action contre *S. aureus*. Il existe toutefois certains antibiotiques totalement inopérants contre ce pathogène. Il s'agit de l'aztréonam appartenant à la classe des β-lactamines ou des quinolones de première génération comme la fluméquine, l'acide pipémidique, nalidixique ou encore oxolinique, qui ont notamment permis de confectionner des milieux sélectifs. Il est important de noter que certains antibiotiques sont à spectre large comme la Fosfomycine, et d'autres sont à spectre plus étroit comme la Vancomycine, la Teicoplanine ou encore l'acide fusidique. L'utilisation plus raisonné des antibiotiques à spectre étroit permet d'éviter la destruction du microbiote lors des traitements, ce qui pourrait accélérer la récupération et éviter des surinfections (102).

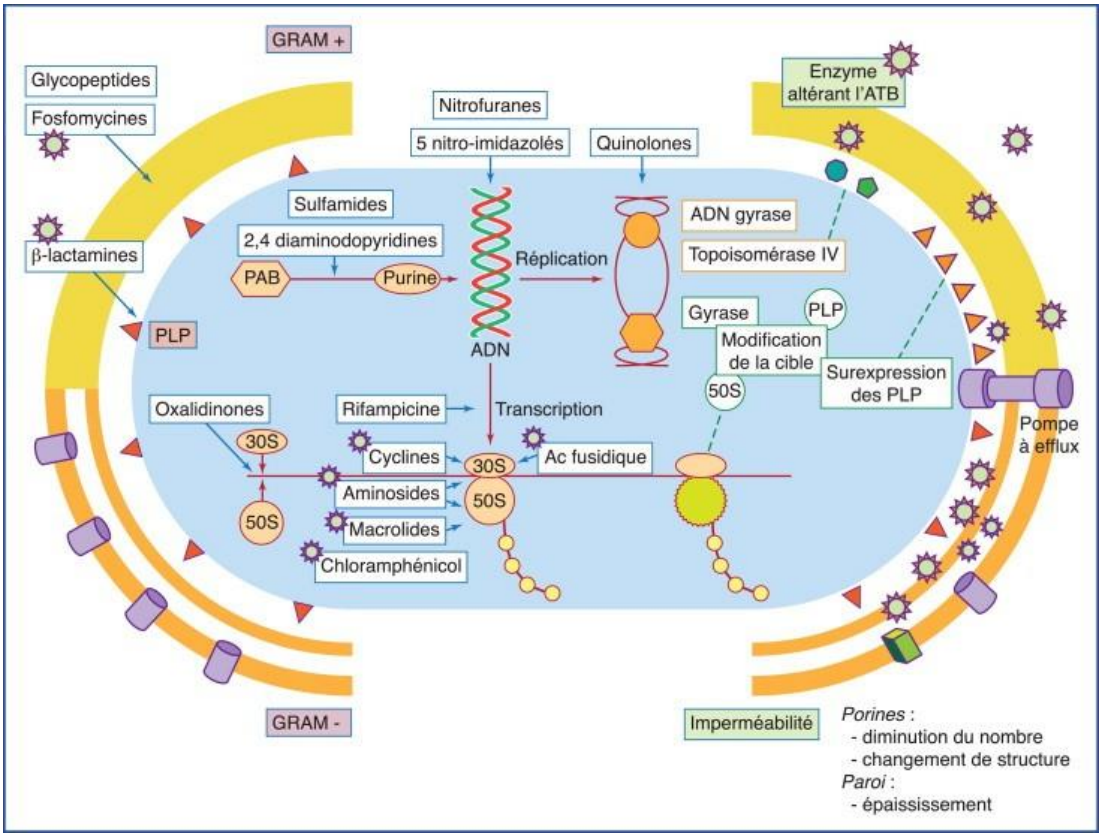


Fig. 20 : ***Les différents types d'antibiotiques utilisé contre les bactéries.*** *Les antibiotiques cibles différentes fonctions bactériennes comme la synthèse de la paroi bactérienne, la synthèse de la membrane cytoplasmique, la synthèse protéique ou encore l'inhibition de la synthèse de l'ADN (103).*

Une liste (non-exhaustive) des principales molécules utilisées pour traiter des infections bactériennes contre *S. aureus*, leurs mécanismes d'action et des résistances associées sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous.

Famille d'ATB	Principales molécules	Mécanismes d'action	Mécanismes de résistance
β-lactamines	**Pénicillines :** - Pénicilline G : **benzylpénicilline** : Pénicilline G® forme retard : Extencilline® - Pénicilline V : Oracilline® - Pénicilline M : **oxacilline** : Bristopen®, **cloxacilline** : Orbenine® - Pénicilline A : **ampicilline** : Totapen®, **amoxicilline** : Clamoxyl®, **bacampicilline** : Penglobe®, **pivampicilline** : Proampi® - Pénicilline A + inhibiteurs de b-lactamases (IBL) : **amoxicilline + acide clavulanique** : Augmentin®, **ampicilline + sulbactam** : Unacim® - Amidino-pénicilline : **pivmécillinam** : Sélexid® - Carboxy-pénicilline : **ticarcilline** : Ticarpen® - Carboxy-pénicilline + inhibiteur de b-lactamases : **ticarcilline + acide clavulanique** : Claventin® - Uréido-pénicilline : **pipéracilline** : Pipérilline®, **mezlocilline** : Baypen® - Uréido-pénicilline + inhibiteurs de b-lactamases : **pipéracilline + tazobactam** : Tazocilline® **Céphalosporines :** -Céphalosporines de 1ère génération (C1G) - Injectables : **céfalotine** : Kéflin®, **céfapirine** : Céfaloject®, **céfazoline** : Céfacidal® - Orales : **céfalexine** : Kéforal®, **céfadroxil** : Oracéfal®, **céfaclor** : Alfatil®, **céfatrizine** : Céfaperos®, **cefradine** : Kelsef® - Céphalosporines de 2ème génération (C2G) : **céfamandole** : Kéfandol®, **céfuroxime** : Zinatt®	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane par analogie de structure avec le substrat des PLP (D-ALA – D-ALA) et agissent donc par inhibition compétitive. Elles possèdent une activité bactéricide temps-dépendante.	Enzymes inactivatrices Pénicillinase (haut et bas niveau), TRI (pénicillinase résistant aux inhibiteurs), céphalosporinase, céphalosporinase déréprimée, b-lactamase à spectre élargie, carbapénémases …. Modification de la cible - Mutation sur les PLP : PLP2a des SARM PLP1a, 2x, 2a … des pneumocoques - Hyperproduction de PLP : PLP5 des entérocoques (*E. faecium*) Imperméabilité Mutation de la porine D2 (*P. aeruginosa*) Efflux *P. aeruginosa*

	Céphamycines : **céfoxitine** : Méfoxin®, **céfotétan** : Apacef® - Céphalosporines de 3ème génération (C3G) : - Injectables : **céfotaxime** : Claforan®, **ceftriaxone** : Rocéphine®, **ceftazidime** : Fortum®, **cefsulodine** : Pyocéfal® - Orales : **céfopérazone** : Céfobis®, **céfotiam** : Texodil®, **céfixime** : Oroken®, **cefpodoxime** : Orelox®, **Oxacéphème** : **latamoxef** : Moxalactam® - Céphalosporine à large spectre ou céphalosporine de 4ème génération (C4G) : **céfépime** : Axépim®, **cefpirome** : Céfrom® **Monobactams :** **Aztréonam** : Azactam® **Carbapénèmes :** **Imipènème** : Tiénam® **Méropénème** : Méronem® **Ertapénème** : Invanz®		
Glycopeptides	**Vancomycine** : Vancocine® **Teicoplanine** : Targocid®	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane par fixation sur le résidu D-ALA – D-ALA empêchant l'action des PLP par encombrement stérique	Modification de la cible Remplacement du résidu D-ALA – D-ALA par D-ALA – D-SER ou D-ALA – D-Lac
Fosfomycine	**Fosfomycine** : Fosfocine®, Uridoz®, Monuril®	Inhibition de la synthèse d'un précurseur du peptidoglycane par inhibition compétitive par analogie de substrat de la pyruvyl-transférase Le franchissement de la membrane plasmique se fait par un système de transport spécifique (glp T, uhp T)	**Défaut de transport de l'antibiotique Enzymes inactivatrices** Glutathion transférase, hydrolase …
Sulfamides et 2,4 diamino-pyridines	Sulfamides : **Sulfadiazine** : Adiazine® **Sulfaméthisol** : Rufol® 2,4 diaminopyridines **Triméthoprime** (+ sulfaméthoxazole) : Bactrim® **Pyriméthamine** (+ sulfadoxine) : Fansidar®	Inhibition de la synthèse des bases puriques. Les sulfamides sont des analogues compétitifs de la dihydroptéroate synthétase. Les 2,4 diaminopyridines sont des analogues compétitifs de la dihydrofolate réductase.	**Mutation de la cible Hyperproduction des enzymes cibles**
Nitrofuranes	**Nitrofurantoïne** : Furadantine® **Nifuroxazide** : Ercéfuryl®	Altération de l'ADN après réduction du groupement NO_2	

5 nitro-imidazolés	**Métronidazole** : Flagyl® **Métronidazole + spiramycine** : Rodogyl®	Coupure des brins d'ADN par formation de radicaux libres	
Quinolones	Quinolones de 1ère génération : **Acide nalidixique** : Négram® **Acide pipémidique** : Pipram® Quinolones de 2ème génération ou fluoroquinolones : **Péfloxacine** : Péflacine® **Norfloxacine** : Noroxine® **Ofloxacine** : Oflocet® **Ciprofloxacine** : Ciflox® **Enoxacine** : Enoxor® **Levofloxacine** : Tavanic® **Moxifloxacine** : Izilox®	Inhibition des étapes de réplication et de transcription de l'ADN. Les quinolones forment un complexe avec l'ADN et la gyrase ou la topoisomérase IV (enzymes assurant le déroulement ou le surenroulement de l'ADN) Antibiotiques à activité bactéricide.	Mutation de la cible ADN gyrase (gyrA, gyrB) topoisomérase IV (parC, parE) Imperméabilité Déficit de l'expression des porines Efflux
Oxazilidones	**Linézolide** : Zyvoxid®	Inhibition de la phase d'initiation de la synthèse protéique	
Rifampicine	**Rifampicine** : Rifadine®	Inhibition de la transcription par inhibition de l'ARN polymérase ADN dépendante	
Cyclines	**Tétracycline** : Hexacycline® **Doxycycline** : Vibramycine® **Minocycline** : Minocine® **Métacycline** : Lysocline® **Lymécycline** : Tetralysal® **Tigécycline** : Tigacyl®	Fixation irréversible sur la sous-unité 30S du ribosome et inhibition de la phase d'élongation de la synthèse protéique. Antibiotique à activité bactériostatique	
Aminosides	**Streptomycine** : Streptomycine® **Kanamycine** **Tobramycine** : Nebcine®, Tobrex® **Gentamicine** : Gentalline® **Amikacine** : Amiklin® **Dibékacine** : Débékacyl® **Nétilmicine** : Nétromycine® **Spectinomycine** : Trobicine®	Fixation sur les sous-unités 30S ± 50S du ribosome et inhibition de toutes les étapes de la synthèse protéique : initiation, élongation, terminaison Activité bactéricide rapide et concentration dépendante Synergie d'action avec les antibiotiques détruisant la membrane	Enzymes inactivatrices - Aminosides phospho-transférases (APH) - Aminosides nucléotidyl-transférases (ANT) - Aminosides acétyl-transférases (AAC) Il existe plusieurs sous-groupes de chaque enzyme. Imperméabilité Modification du LPS, diminution des porines Modification de la cible Modification du ribosome
MLS	Macrolides - Macrolides à 14 atomes : **Erythromycine** : Erythrocine® **Roxithromycine** : Rulid® **Clarythromycine** : Zéclar®, Naxy® **Dirithromycine** : Dynabac® - Macrolides à 15 atomes : **Azithromycine** : Zithromax® - Macrolides à 16 atomes : **Josamycine** : Josacine® **Spiramycine** : Rovamycine® **Spiramycine + métronidazole** : Rodogyl® **Midécamycine** : Mosil®	Fixation sur la sous-unité 50S du ribosome et blocage de l'élongation. Les macrolides et les lincosamides possèdent une activité bactériostatique Les synergistines sont bactéricides.	Modification de la cible Méthylation de la sous-unité 50S (erm) **Enzymes inactivatrices** Acétyl-transférase, hydrolase, acétylase **Efflux**

	Lincosamides **Lincomycine** : Lincocine® **Clindamycine** : Dalacine® Synergistines **Pristinamycine** : Pyostacine® **Dalfopristine + quinupristine** : Synercid® Kétolides **Télithromycine** : Ketec®		
Phénicolés	**Chloramphénicol** : Tifomycine® **Thiamphénicol** : Thiophénicol®	Inhibition de la phase d'élongation de la synthèse protéique par fixation sur la sous-unité 50S du ribosome	**Enzymes inactivatrices** Chloramphénicol acétyltransférase
Acide fusidique	**Acide fusidique** : Fucidine®	Inhibition de la phase d'élongation de la synthèse protéique par formation d'un complexe avec le ribosome	
Polymyxines B et colistine	**Colistine** : Colimycine®	Altération de la membrane plasmatique par formation de pores	

*Tab. 3 : **Liste des antibiotiques utilisés contre S. aureus**, leur mode d'action et les résistances associées. PLP : protéines liant les pénicillines ; PAC : acide para-amini-benzoïque. Tableau réalisé par l'association française d'urologie (103).*

Malgré une quantité importante de molécules utilisées en thérapeutique, ce tableau met en exergue les nombreux mécanismes mis en œuvre par les bactéries pour contourner l'effet de ces molécules. Le développement des résistances aux antibiotiques demande une meilleure utilisation de ces molécules, notamment en prophylaxie. Malgré cela, il existe encore quelques molécules présentant une efficacité contre ce pathogène. La Rifampicine (104), l'acide Fusidique (105) et la Fosfomycine sont utilisés couramment pour des infections cutanées. Ces molécules doivent être couplées avec une autre du fait de l'apparition rapide de résistance lorsqu'elles sont utilisées seules. Les SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) sont pour la plupart sensibles à la vancomycine (106) ou encore à la gentamicine. Ces molécules, du fait de leur action toxique pour l'hôte, ne peuvent pas être utilisées en routine en clinique.

De nouvelles molécules sont en cours de développement afin de lutter contre les résistances apparaissant contre ces molécules de dernière intention.

On peut noter le Linézolide appartenant à une nouvelle classe d'antibiotiques (les Oxazolidines) et possédant une CMI (concentration minimale inhibitrice) particulièrement basse contre des souches résistantes à la méthicilline et ou à la vancomycine (107). La découverte d'un nouvel antibiotique appelé la téixobactine en 2015 vise la synthèse de précurseurs lipidiques du peptidoglycane et de l'acide teichoïque (108). Cette molécule serait efficace chez les grams positifs, et ne présenterait pas de souches pouvant muter et survivre contre son action. Cependant, un rapport récent suggère que des bactéries dépourvues de paroi pourraient échapper à l'action de toutes molécules visant sa synthèse (109) ! Parmi les nouveaux antibiotiques on peut noter

l'ETX1317, la myxopyronine (fixation à de nouveaux sites de fixation de l'ARN polymérase) ou encore le contournement du mécanisme CRISPR (110).

Une autre classe d'antibiotiques ciblant la voie de synthèse des acides gras, la voie FASII (Fatty Acid Synthesis II), présenterait un enjeu contre *S. aureus* du fait d'une molécule en essai clinique en phase II présentant des résultats décrits comme prometteurs. Notre étude porte sur l'utilisation de ce type d'antibiotique, et va être présentée au cours du prochain chapitre.

III) La voie de synthèse des acides gras : FASII

Les acides gras sont omniprésents et ont un rôle essentiel chez tous les organismes vivants aussi bien procaryotes qu'eucaryotes. Ils permettent la production de nombreuses molécules, notamment les phospholipides, constituant prédominant de la membrane, les lipoprotéines, les acides lipotéichoïques, des pigments etc. Ces acides gras interviennent dans des voies de régulation ou encore de signalisation. L'importance de la présence des acides gras pour le bon fonctionnement des bactéries motive la recherche de nouvelles molécules pouvant bloquer la synthèse des acides gras. Cette synthèse chez *S. aureus* est appelée FASII pour *Fatty Acid Synthesis II.* C'est donc cette voie qui est visée par un nouveau type d'antibiotique.

1) Les rôles des acides gras

Les acides gras peuvent être retrouvés sous forme libre ou sous forme estérifiée et être une composante de molécules plus importantes. Ils ont de nombreuses fonctions importantes (Fig.21):

-Sous forme libre

- Mécanisme de protection antibactérien : toxicité (111)
- Métabolites énergétiques
- Communication intercellulaire

- Sous forme estérifiée

- Composants et/ou nécessaire pour l'adressage de facteurs de virulence
- Composants de cofacteurs ou de vitamines
- Composants des phospholipides, LTA, lipoprotéines et pigments
- Intégrité des membranes cellulaires

La quantité totale d'acides gras présents dans les bactéries est importante (112). Ils sont majoritairement trouvés sous forme estérifiée et non sous forme libre. A l'inverse, les acides gras présents sur la peau, dans la cavité nasale ou dans les zones d'inflammation sont présents sous forme libre (113). Cette présence sous forme libre est une composante importante du système antimicrobien de l'hôte (114). En étant libres, ils peuvent être toxiques vis-à-vis des membranes bactériennes (115).

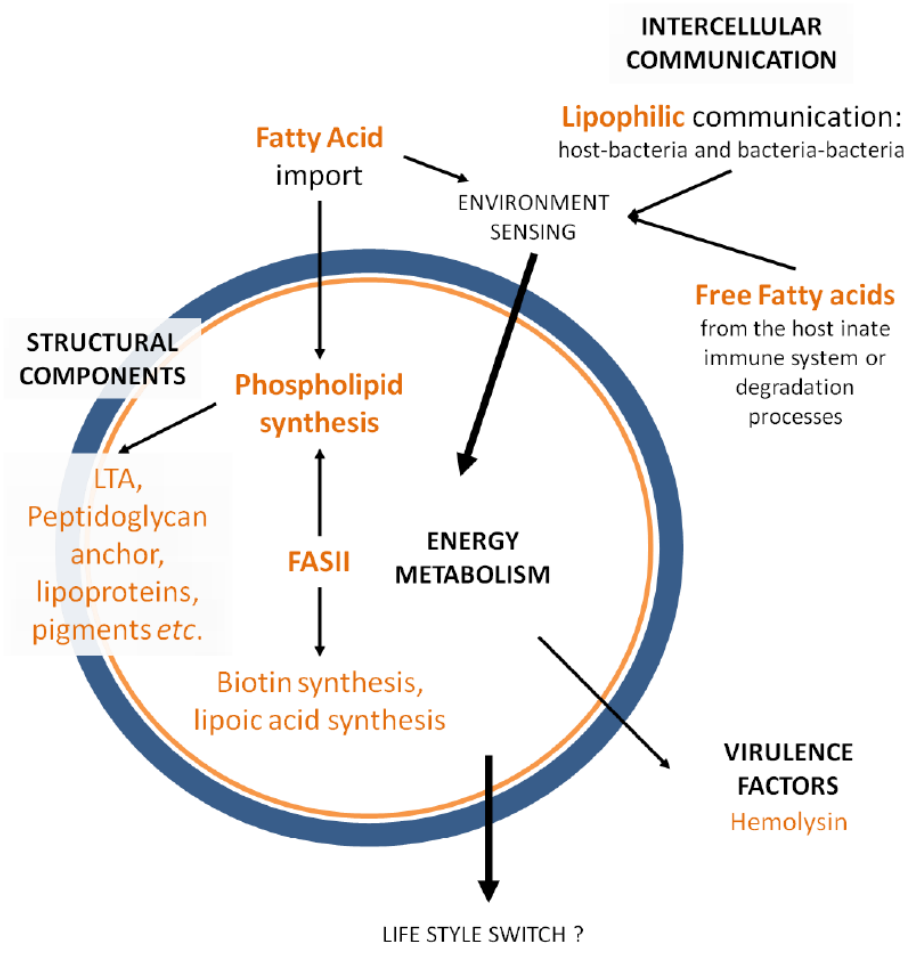


Fig. 21 : ***Les acides gras sont impliqués dans une majorité des fonctions chez S. aureus.*** *En orange sont représentées les molécules composées d'acides gras chez S. aureus. Ils sont principalement retrouvés dans la membrane plasmique, la voie de synthèse des acides gras (FASII) mais aussi dans les lipoprotéines, les LTAs (acide lipotéichoïque au niveau de la paroi) ou encore dans des facteurs de virulence et de communication avec l'hôte ou d'autres bactéries (116).*

La classification des lipides repose sur leurs structures, leurs origines métaboliques, leurs propriétés physicochimiques ou biologiques.

Les acides gras sont des molécules non ionisées interagissant peu avec l'eau. Ceci est dû à la présence de la chaîne carbonée responsable d'une hydrophobicité (à l'inverse, les groupes chargés électriquement, ionisés ou groupes dipolaires interagissent avec l'eau et sont dits hydrophiles).

Les acides gras sont des acides monocarboxyliques qui comportent une chaîne carbonée de quatre carbones ou plus. Ils peuvent être saturés, insaturés, ramifiés. La nature des acides gras confère des propriétés physiques aux molécules plus complexes auxquelles ils appartiennent (Fig. 22).

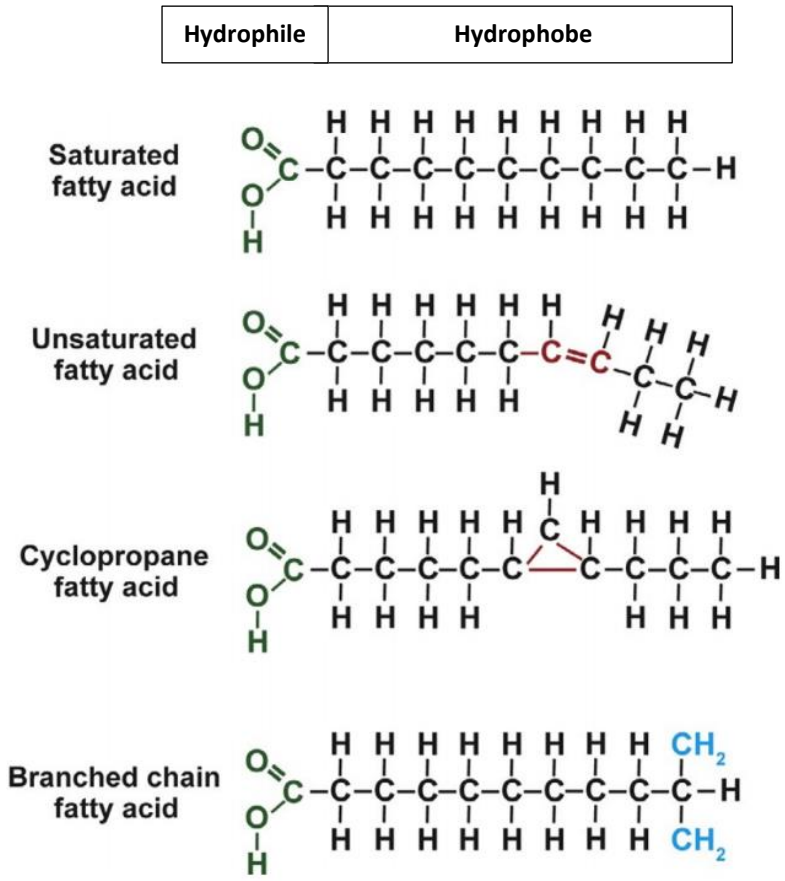


Fig. 22 : ***Les principales classes d'acides gras:*** *Les acides gras peuvent être saturés ou insaturés, de forme cis ou trans suivant la position de l'insaturation, branchés iso- ou anteiso- (en seconde ou troisième position à partir de l'extrémité distale de la chaîne) (117).*

S. aureus est capable de synthétiser des acides gras ramifiés à partir d'acides aminés ramifiés (leucine, valine, isoleucine). Les acides gras « iso » proviennent de leucine (→*iso* impair) et de valine (→*iso* pair) et contiennent un groupement methyl en seconde position à partir de l'extrémité distale de la chaîne. L'acide gras « *ante*iso » ou *ai*, provient de l'isoleucine, et contient un groupement methyl localisé en troisième position de l'extrémité de la chaîne. Les acides gras présents dans les phospholipides et synthétisés par les Firmicutes sont en général composés de 12 à 22 carbones (acides gras à chaîne longue). L'acide gras ramifié ***ai*15 (iC15 :0) est l'acide gras principal de *S. aureus***.

La majorité des acides gras dans une cellule bactérienne permet de synthétiser les phospholipides, briques essentielles des membranes (Fig. 23). Chez *B. subtilis* comme *S. aureus* les acides gras sont à chaînes droites et branchés. A l'inverse *E. coli* et *S. peumoniae* synthétisent principalement des phospholipides à chaînes droites.

Les acides gras composent les phospholipides.

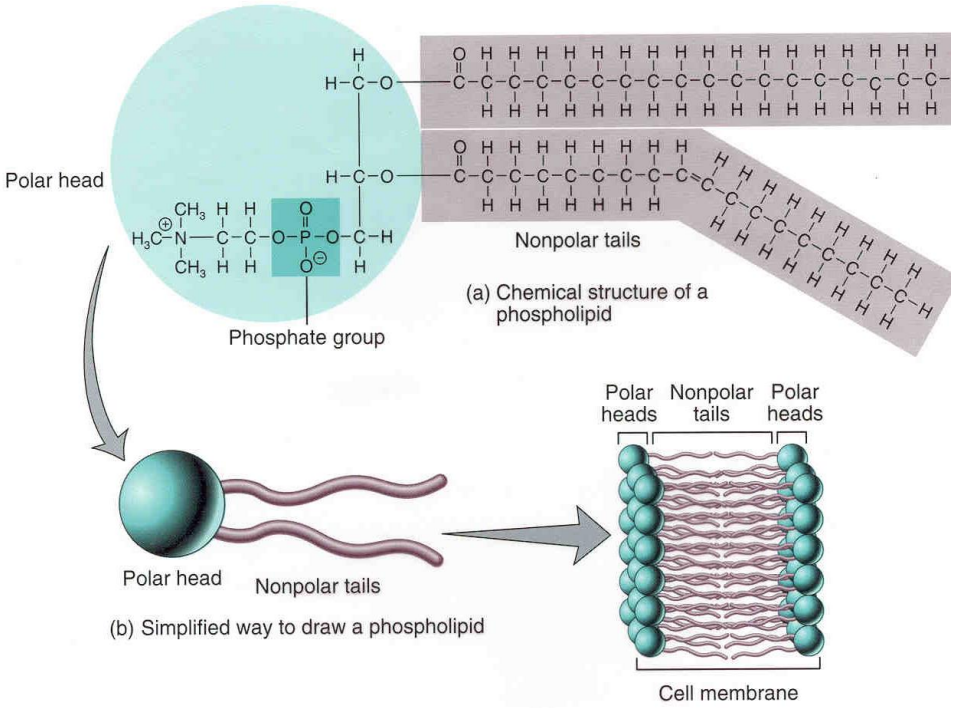


Fig 23 : ***Les acides gras permettent de former les phospholipides qui sont eux-mêmes essentiels à la formation des membranes*** **(118).** *Les propriétés amphiphiles des acides gras permettent de former des liposomes, micelles ou encore les membranes plasmiques (119)*

Il existe plusieurs types de phospholipides chez les bactéries (Fig. 24). Les principaux retrouvés dans la membrane de *S. aureus* sont le phosphatidylglycérol, la cardiolipine (di-phosphatidylglycérol), et le lysyl-phophatidyl-glycérol (chargé positivement par une lysine).

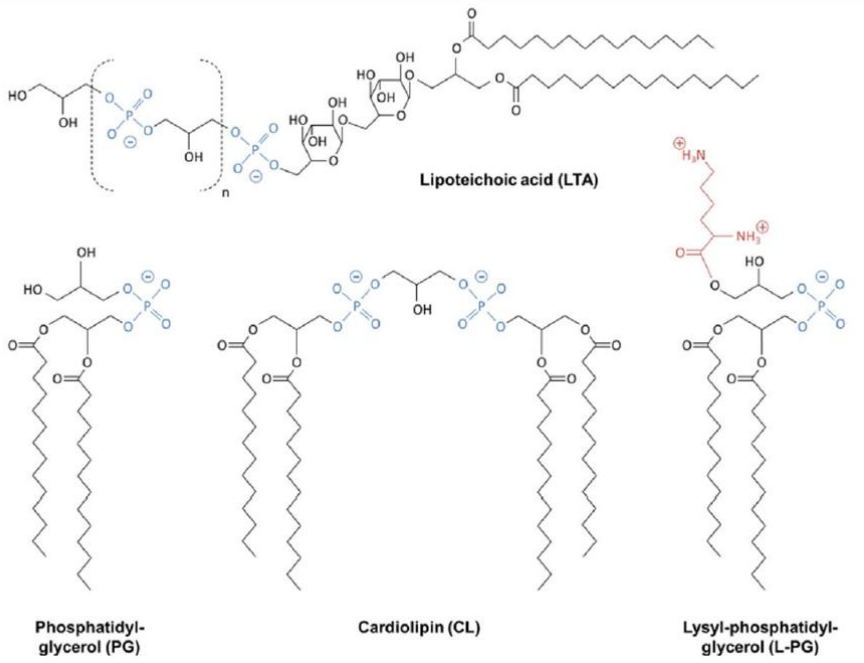


Fig. 24 : ***Acide lipotéichoïque et les principaux phospholipides de S. aureus*** *qui sont le phosphatidylglycérol, la cardiolipine, et le lysyl-phosphatidylglycérol (120). En bleu, sont représentés les groupements phosphates et en rouge la tête polaire du lysyl-phosphatidyl-glycérol.*

Le **phosphatidyl-glycérol** est lié aux protéines transmembranaires et permet leurs bonnes interactions (121).

La **cardiolipine** est classifiée comme un lipide de « haute courbure » qui est due à la section transversale dans la tête par rapport à son domaine hydrophobe, ce qui induit une forte déformation de la membrane plasmique. Cette molécule joue un rôle dans plusieurs fonctions, notamment dans la formation de domaines dynamiques dans les sites de division cellulaire (122). La synthèse de la cardiolipine est due à l'enzyme **cls** qui induit la synthèse de cardiolipine à partir de phosphatidylglycérols.

Le **lysyl-phosphatidyl-glycérol** jouerait un rôle dans la colonisation de milieux légèrement acides comme la muqueuse humaine ainsi que dans la résistance aux peptides antimicrobiens de l'hôte, qui sont aussi chargés positivement (123-125). L'enzyme **mprF** modifie les phosphatidylglycérols en les chargeant par un ajout de lysyl.

L'**acide lipoteichoïque (LTA)** est un constituant majeur de la paroi, et participe à la protection contre les stress environnementaux. Ils permettent de contrôler des activités enzymatiques du fait de la liaison aux récepteurs de surface. Ces molécules sont ancrées par une ancre dite lipidique. Il s'agit d'une ancre glycérolipidique diglucosyldiacylglycérol. La synthèse des LTAs fait rentrer en jeu plusieurs enzymes. La première est ***ypfP*.** Cette glycosyltransférase transfère 2 résidus glucosyle sur un diacylglycérol (DAG). Cette molécule est le point d'ancrage de la membrane pour l'acide lipotéichoïque (LTA). Par la suite, deux gènes sont nécessaires à la synthèse des LTAs. ***ltaA*** permet le passage par une flipage, c'est-à-dire le passage de la partie interne vers la partie externe de la membrane. Enfin ***ltaS*** transfère des molécules de glycerol phosphate au Glc_2-DAG précédemment produit (126).

Les **lipoprotéines** : Il est estimé qu'il y a environ 50 à 70 lipoprotéines chez *S. aureus* et plusieurs d'entres elles seraient liées à l'acquisition de nutriments (127). Les lipoprotéines sont des protéines liées à un lipide leur permettant un ancrage au niveau de la membrane. Ces protéines peuvent jouer un rôle dans la pathogénicité, en plus d'être une aide à l'acquisition des nutriments (128,129).

Les **pigments** : Le pigment donnant la couleur caractéristique de *S. aureus* est un caroténoïde appelé la staphyloxanthine (Fig. 25). Cette molécule est composée de longues chaînes carbonées nécessitant la synthèse par la voie FASII. La staphyloxanthine jouerait un rôle dans la perméabilité membranaire (en l'augmentant), dans la défense contre les espèces réactives de l'oxygène, et serait une potentielle cible thérapeutique. La dernière étape de synthèse de la staphyloxanthine nécessite l'estérification d'un glucose avec la partie carboxyle de l'anteiso C15: 0. Il semblerait toutefois que la synthèse de la staphyloxanthine et la voie FASII ne sont pas corégulées (127).

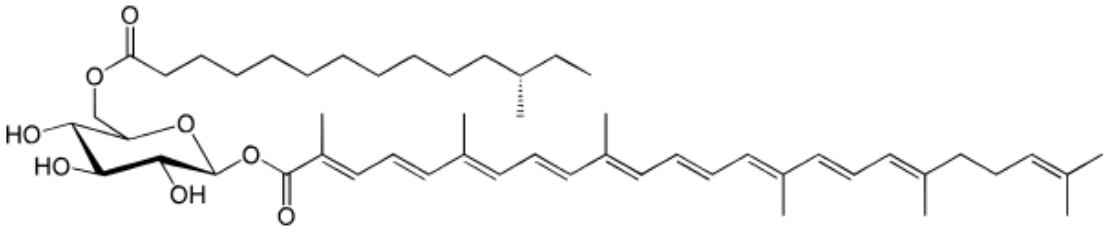


Fig. 25 : ***Représentation de la staphyloxanthine****. Ce pigment est composé de deux longues chaînes carbonées, il est responsable de la couleur dorée chez certaines souches de S. aureus, ce pigment peut aussi agir comme un facteur de virulence.*

La quantité de staphyloxanthine pourrait être liée à la composition en acides gras synthétisés par *S. aureus (127)*.

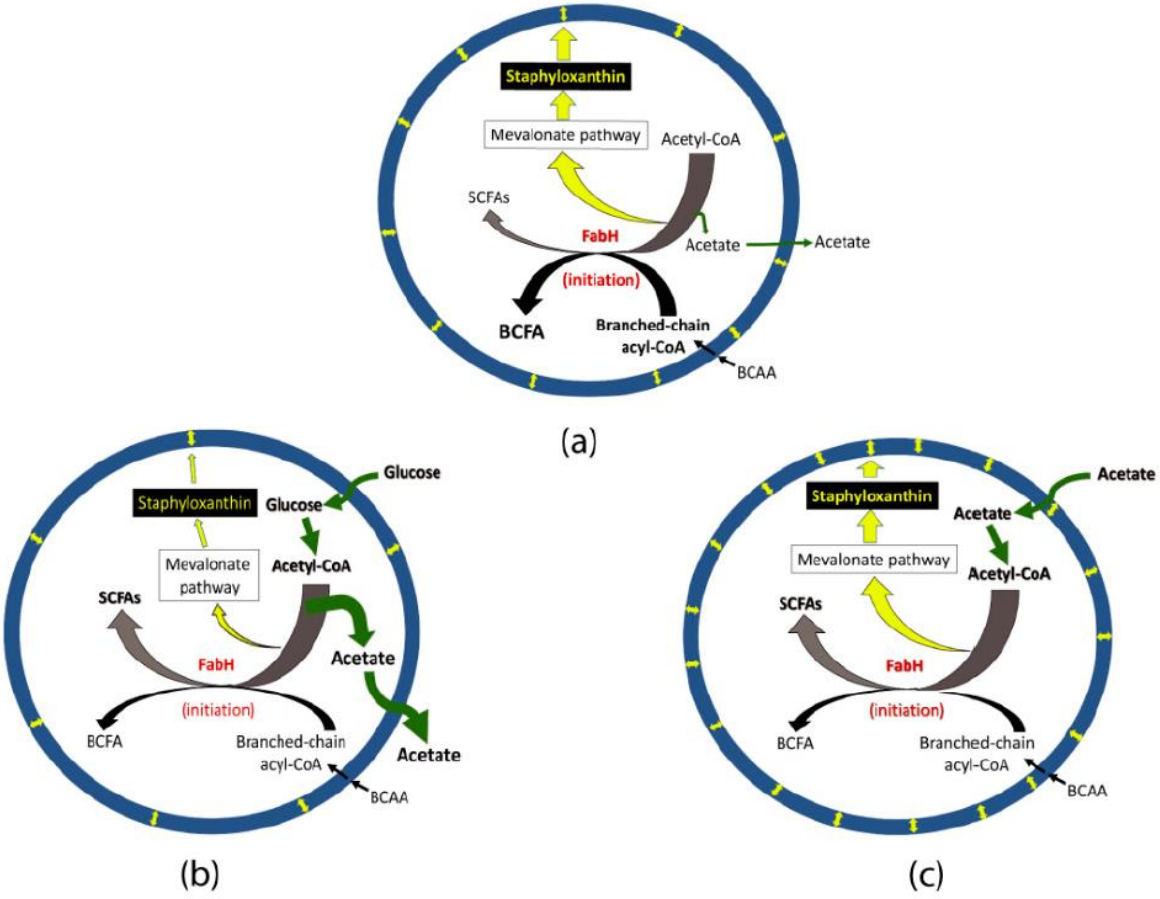


Fig. 26 : ***Proposition de modèle montrant le lien entre les acides gras et la composition en staphyloxanthine.*** *a) Une proportion importante de BCFAs est utilisée pour synthétiser les acides gras ramifiés à cause de l'affinité pour FabH et laisse une quantité importante d'acétyl-CoA qui servira à produire de la staphyloxanthine. b) Une supplémentation en glucose cause une production d'acétyl-CoA qui est converti en acétate et sécrété. c) Une supplémentation en acétate augmente la quantité d'acétyl-CoA et permet ainsi une augmentation de la production de staphyloxanthine et de SCSFAs.*

Malgré le rôle de ces différentes molécules, elles ne semblent pas être nécessaires pour la survie bactérienne. Les differents phénotypes des mutants liés à la synthèse des acides gras sont résumés dans un tableau de cette publication (130).

2) La membrane cellulaire

La propriété des acides gras d'être hydrophobes (donc insolubles dans l'eau mais de pouvoir l'être dans les solvants organiques) permet de compartimenter les cellules et de former ainsi la membrane cellulaire. La membrane plasmique est constituée d'environ 40% de phospholipides (en poids sec) (Fig.28). Ces phospholipides représentent 10% du poids sec de la cellule (112), et constituent une barrière de diffusion semi-perméable, ce qui délimite le cytoplasme de l'extérieur. Lorsque les molécules de phospholipides interagissent fortement entre elles et sont dans un état dense et ordonné, la rigidité de la membrane est augmentée. Cette rigidité est favorisée par les acides gras saturés lorsque la température du milieu est en dessous de la température de transition. Les acides gras saturés sont des chaînes droites du fait qu'elles ne contiennent pas de doubles liaisons, et favorisent donc la « rigidité ». A l'inverse, au-dessus de la température de transition les molécules de phospholipides interagissent moins fortement entre elles et sont dans un état plus désordonné, ce qui mène à une membrane « fluide ».

Au contraire, les insaturés possèdent une double liaison (pour les monoinsaturés) ou plusieurs dans le cas des polyinsaturés. Ces doubles liaisons forment des « kink » responsables de la fluidité membranaire en comparaison des acides gras saturés. La longueur des acides gras peut aussi influencer la fluidité membranaire. Les forces cohésives hydrophobes sont d'autant plus fortes que les chaînes sont saturées et longues. Ces interactions sont plus faibles lorsque les chaînes comportent des doubles liaisons de configuration cis qui forment une angulation diminuant ainsi l'interaction avec les chaînes voisines.

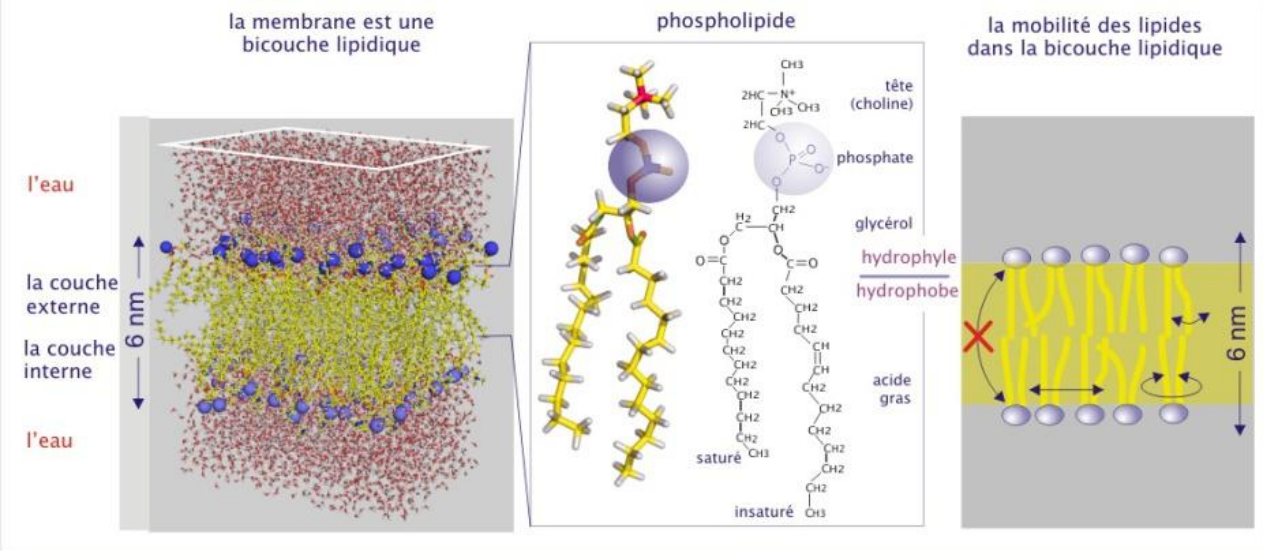


Fig. 28 : ***La membrane est composée de phospholipides formés d'acides gras et d'une tête hydrophile (131). La rigidité membranaire dépend de la proportion des acides gras saturés et insaturés.*** *Les acides gras saturés sont responsables de la rigidité membrane, tandis que les acides gras insaturés permettent une fluidité membranaire accrue du fait de l'angle produit par les insaturations.*

La composition de la membrane est ajustée en réponse à : la température, la pression, la concentration en ions, au pH, au stade de croissance et sa forme sessile *versus* planctonique, des molécules nocives présentes dans le milieu comme les antibiotiques, détergents ou encore les défenses de l'hôte (130). Par ailleurs, les protéines membranaires sont responsables des processus cellulaires essentiels : la respiration, la génération d'ATP par gradient de protons, et le « sensing » de l'environnement (132). Une régulation fine doit être faite par la bactérie afin de s'adapter à ces changements environnementaux (133). L'état de la membrane (« rigide » *versus* « flexible ») impacte fortement l'expression des protéines membranaires. La membrane est un milieu complexe et non uniforme. De nombreux « microdomaines », appelés radeaux lipidiques, sont responsables de la fonction de nombreuses protéines (134,135).

3) La synthèse des acides gras

a) La voie FASII

Les étapes de la voie FASII sont similaires chez les microorganismes la possédant. Elle comprend des étapes de condensation, de réduction, et de déshydratation des liaisons carbone-carbone. En revanche suivant les organismes, les enzymes varient sans pour autant changer l'organisation de cette voie. Chez *Staphylococcus aureus* les gènes de la voie FASII sont répartis sur différents *loci* (Fig. 29).

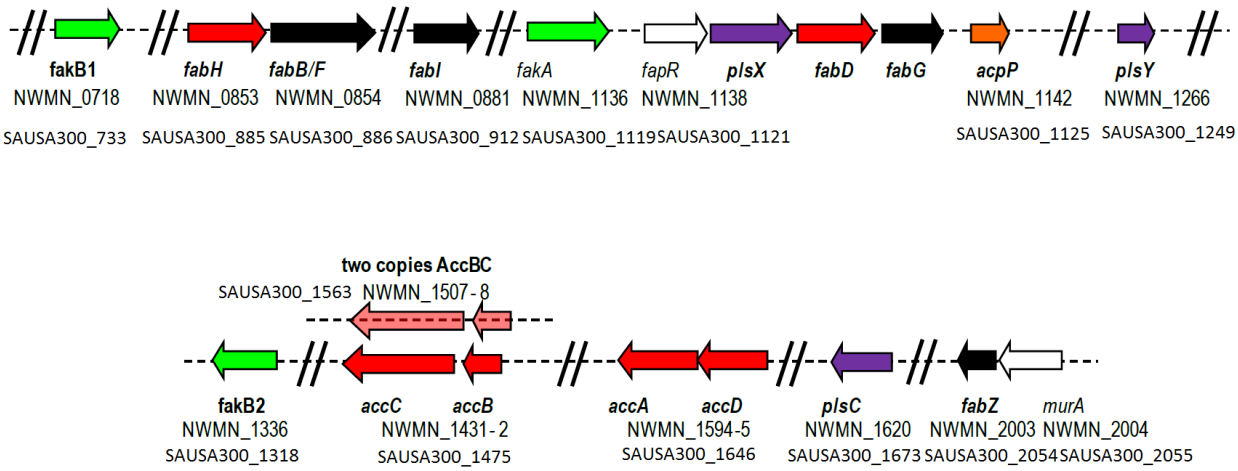


Fig. 29: ***Organisation schématique des gènes de la voie FASII et des gènes associés chez S. aureus.*** *Le gène fabH en rouge est impliqué dans l'étape d'initiation, les gènes en noir sont impliqués au niveau du cycle d'élongation, en violet la terminaison, et dans la synthèse des acides phosphatidiques. En vert les gènes fak sont responsables de l'incorporation des acides gras exogènes : fakA, fakB1 (C14 :0 et C16 :0) et fakB2 (C18 :1) par phosphorylation et permettant l'accrochage au glycérol-3-phosphate par les gènes plsX, plsY et plsC (136). FapR (en blanc) régule la voie FASII et la synthèse des phospholipides. Il existe deux copies des gènes AccBC. Le rôle des copies en rose clair n'est pas encore compris. Les numéros des gènes NWMN correspondent aux gènes de la souche Newman, et les gènes SAUSA300 correspondent à la souche JE2 FPR3757 qui sont les deux souches utilisées au cours de ces travaux. Schéma modifié de sa version originale (137).*

La synthèse des acides gras se déroule en trois étapes; l'**initiation**, l'**élongation** et la **terminaison**. Cette synthèse permet chez *S. aureus* de produire des acides gras de longueurs qui varient entre C14 et C20 (avec exceptions). *S. aureus* produit des acides gras saturés ramifiés ou non. La forme anteiso, en particulier *ai*15, est le principal acide gras synthétisé par *S. aureus.* D'autres bactéries produisent des acides gras insaturés à la place des ramifiés.

La protéine **ACP** pour « acyl carrier Protein » est essentielle à la synthèse des acides gras. En formant des thioestères avec les intermédiaires des acides gras lors de la synthèse, l'ACP sert de chaperonne qui amène l'intermédiaire d'une enzyme à l'autre pendant tout le cycle FASII. Elle permet d'éviter la dégradation des intermédiaires par la voie de dégradation Fad qui sera discuté par la suite. Cette protéine joue aussi un rôle important dans l'utilisation des acides gras exogènes que nous étudierons par la suite. L'ACP joue donc un double rôle essentiel.

L'ACP est une petite protéine (~7 kDa) acide hydrophile conservée à travers le monde du vivant. Chez *E. Coli*, l'ACP est abondante et représente environ 0.25% des protéines totales (quantité non limitante) (112). Cette molécule indispensable à la synthèse des acides gras est produite à partir du gène *acpP,* puis est activée par la protéine AcpS par ajout d'un groupement phosphopantothénique au niveau d'une sérine (passage de la forme dite apo à holo). Cette modification active l'ACP, et permet la liaison aux acides gras par une liaison thioestère au sulfhydryl du groupement prosthétique (Fig. 30). Les résidus négatifs de l'ACP vont pouvoir se lier aux résidus positivement chargés des enzymes du FASII, appelés Fab pour « fatty acid biosynthesis » (138). Les états de l'ACP pourraient jouer un rôle régulateur sachant que l'apo-ACP en trop grande quantité est toxique à l'inverse du C18 : 1-ACP qui régule certaines étapes de l'initiation de la voie de synthèse FASII (139).

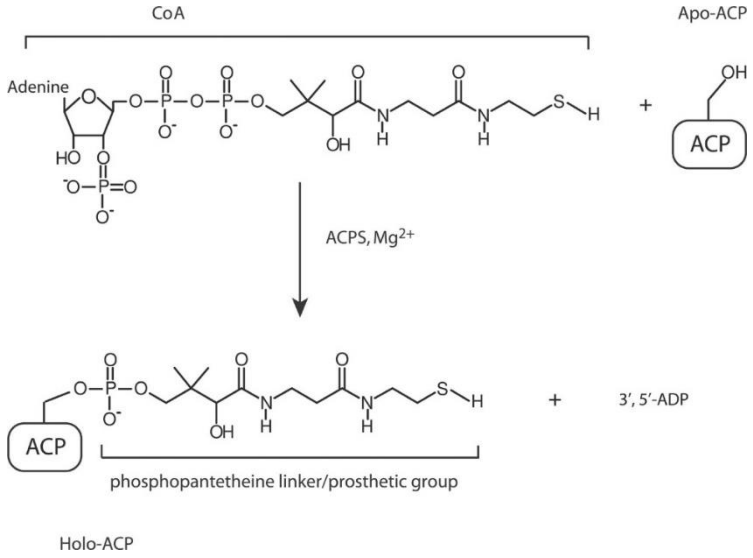


Fig. 30 : ***Activation de l'ACP.*** *Pour activer l'ACP, la protéine doit passer de la forme apo à la forme holo. Cette réaction nécessite la protéine AcpS qui lie un groupement pantothénique à l'ACP. Une fois activée l'ACP peut s'attacher à un groupement acyl. Les résidus négatifs de l'ACP vont permettrent la liaison aux résidus chargés positivement des enzymes de la voie FASII (140).*

Initiation : La première étape de synthèse des acides gras consiste à la production de malonyl-CoA par une acetyl-CoA carboxylase (carboxylation avec un ion hydrogénocarbonate par l'hydrolyse d'un ATP). Les gènes accAD et accBC sont sur 2 opérons distincts (141). Chez *S. aureus* et certaines autres bactéries (par ex., *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes*), des acides aminés ramifiés (isoleucine, valine et leucine) sont des substrats pour la synthèse des acides gras ramifiés (respectivement des acides gras *anteiso*, iso-pair, et iso-impair). Par la suite, FabD catalyse le remplacement du groupement CoA sur le malonyl-CoA par l'ACP. Cette amorce sera ensuite condensée avec les précurseurs (acétyl-CoA, methylbutyryl-CoA, isobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA) pour former le 3-ketoacyl-ACP et pour entamer le cycle FASII. Cette étape nécessite l'enzyme FabH qui aurait une affinité plus importante pour la prise des précuseurs responsables des acides gras branchés que les acetyl-CoA. Cette différence d'affinité expliquerait le fait que l'acide gras majoritaire produit par *S. aureus* est l'*ai* 15 (142,143).

- **AccBCDA :** Acétyl-CoA carboxylase
    - acétyl-CoA → Formation de malonyl-CoA (144)

- **FabD** : Malonyl-CoA : ACP transacylase
    - Malonyl-CoA → Malonyl-ACP

- **FabH** : β-ketoacyl-ACP synthase III
    - acétyl-CoA, methylbutyryl-CoA, isobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA → 3-ketoacyl-ACP

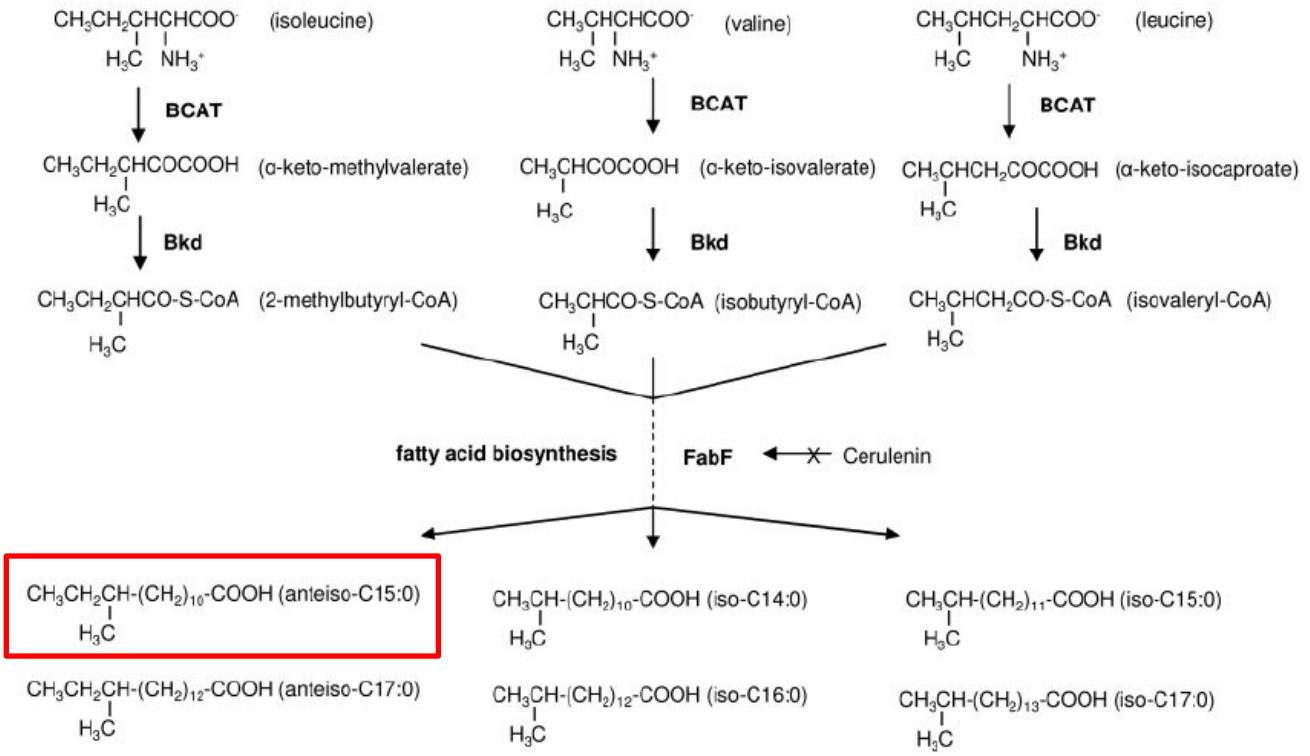


Fig. 31: ***Schéma de la voie de biosynthèse des acides gras branchés à partir des acides amines branchés chez L. monocytogenes*** *(145). BCAT, branched-chain amino acid transaminase; Bkd, branched-chain a-keto acid dehydrogenase; FabH, b-ketoacyl-ACP synthase III; FadD, acyl-CoA synthetase; FabF, b-ketoacyl ACP synthase II.*

Elongation : Une fois « dans » le cycle, l'acide gras est allongé de deux carbones par cycle. Il est d'abord réduit en 3-hydroxyacyl-ACP par la réductase FabG, déshydraté en enoyl-ACP par FabZ, réduit en acyl-ACP par FabI et enfin réduit une nouvelle fois en ketoacyl-ACP par FabF. La fin du cycle FASII est déterminée par la longueur de la chaîne, et pourrait indiquer que le groupement acyl n'aurait pas une forte affinité pour les enzymes de FASII, ou bien qu'il serait trop hydrophobe pour rester dans le cytoplasme. Ce groupement acyl-ACP sera donc utilisé comme substrat pour 2 enzymes qui constituent les premières étapes dans la constitution des phospholipides.

- **FabG** : 3-kéto-acyl-ACP réductase, enzyme très conservée (141).
    - 3-kéto-acyl-ACP → 3-hydroxy-acyl-ACP en oxydant du NADPH.

- **FabZ** : Catalyse la déshydratation d'acides gras de chaîne de toute taille, saturés ou insaturés (141).
    - 3-hydroxy-acyl-ACP → 2-énoyl-ACP

- **FabI** : Enoyl-ACP réductase qui réalise la dernière étape de chaque cycle de biosynthèse.
    - 2-énoyl-ACP → acyl-ACP en consommant du NADPH, H+ ou du NADH, H+. *S. aureus* favorise l'utilisation du NADPH.

- **FabF** : enzyme de condensation (141)
    - Acyl-ACP + malonyl-ACP → ketoacyl-ACP

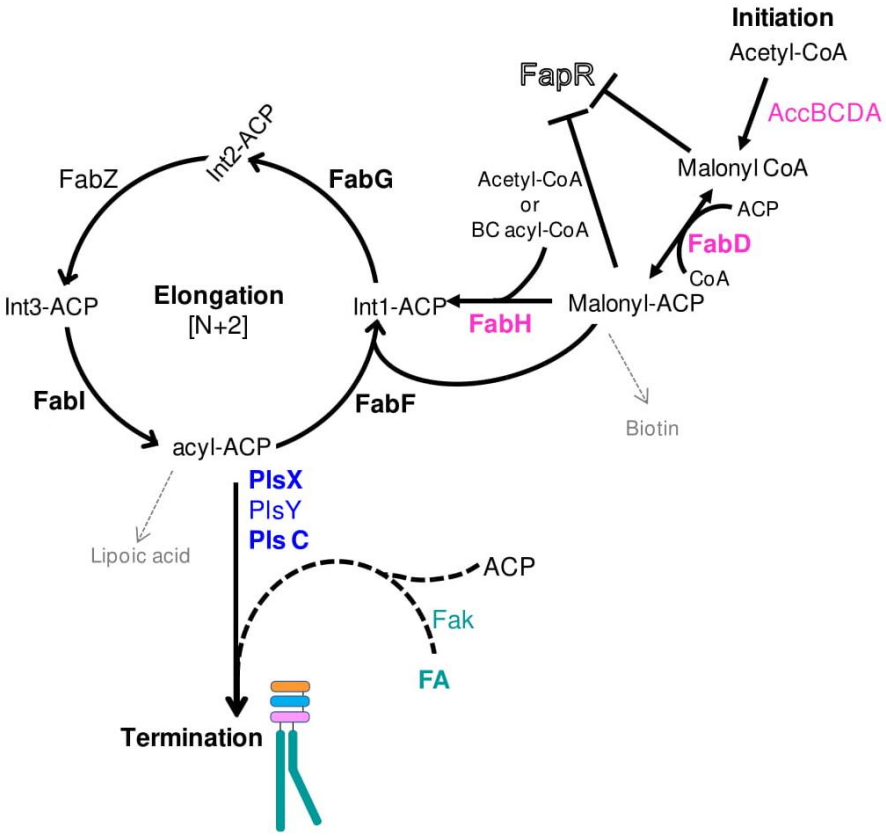


Fig. 32 : ***La voie de synthèse des acides gras : FASII.*** *Cette voie est très conservée. Elle se déroule en trois étapes décrites précédemment : l'initiation, l'élongation et la terminaison. S. aureus peut synthétiser des acides gras branchés à partir d'acides aminés branchés, alors que d'autres bactéries synthétisent uniquement des acides aminés insaturés. Les gènes fak sont essentiels à la phosphorylation des acides gras exogènes. Ils seront discutés dans la 4ème partie. La régulation par FapR est aussi décrite dans la prochaine partie consacrée à la régulation de la voie FASII (137).*

La formation des phospholipides nécessite une étape d'accrochage des acides gras, appelée la terminaison. Cette étape fait suite à la voie FASII.

Terminaison : Une fois le cycle terminé les acyl-ACP vont pouvoir être utilisés pour former les phospholipides. PlsX convertit acyl-ACP en acyl-PO4, qui est ensuite utilisé par PlsY pour attacher le groupement acyl sur la position 1 du glycérol phosphate. Cette formation semble être le substrat pour le placement du 2ème groupement acyl, par PlsC, sur la position 2. En l'absence des eFAs, la position 2 est estérifiée préférentiellement avec des *anteiso* 15 :0 alors que la position 1 porte différents AG, notamment des 17:0 et 18:0 (141). Selon la littérature, la spécificité de PlsC de *S. aureus* empêcherait la bactérie d'utiliser d'autres acides gras que ceux synthétisés *de novo* par la bactérie (115,136,146). Nous verrons par la suite (dans la partie résultat) que cette spécificité n'est pas absolue même hors anti-FASII.

- **PlsX** : acyl-ACP-phosphate-trans-acylase
  - acyl-ACP (endogènes ou exogènes) → acyl-PO4

- **PlsY** : G3P acyl-transférase
  - acyl-PO4 → position 1 du glycérol-phosphate

- **PlsC** : G3P acyl-transférase
  - acyl-PO4 → position 2 du 1-acyl-G3P

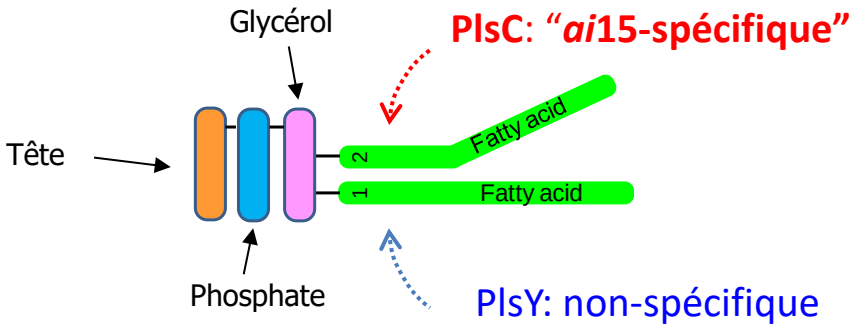


*Fig. 33 : **Phospholipides**. Chez S. aureus, l'enzyme PlsC catalyserait l'acide gras qui occupe la position 2 des phospholipides. Ce fait est généralement accepté d'être spécifique de l'ai15 ce qui sera discuté par la suite. La position 1 du phospholipide est lié à l'enzyme PlsY qui elle ne serait pas spécique d'un acide gras particulier.*

Il est à noter que chez l'animal, les acides gras ramifiés sont généralement absents, tandis que les acides myristique (C14 :0 ; en moindre quantité), palmitique (C16 :0), stéarique (C18 :0) et oléique (C18 : Δ9) sont présents ; cette composition varie selon les organes (113). C'est pour cela que nous utilisons ces acides gras dans nos expérimentations. De plus, l'acide oléique n'est pas produit par *S. aureus,* ce qui nous permet de bien distinguer les acides gras exogènes (voir partie résultat).

Autres fonctions de la voie FASII

La voie FASII n'est pas exclusive à la production d'acides gras. Un intermédiaire de cette voie est utilisé pour la production de la biotine (141) et de l'acide lipoïque (147). La biotine participe à la synthèse de malonyl-CoA, et l'acide lipoique joue un rôle dans l'activité de nombreuses enzymes (Fig. 34). L'acide lipoïque est un cofacteur de complexe multienzymatique, comme la pyruvate déshydrogénase (PDH) ou encore KDH (α-kétoglutarate déshydrogénase). L'acide lipoïque a aussi une fonction antioxydante (chélateur de radicaux libres) (148).

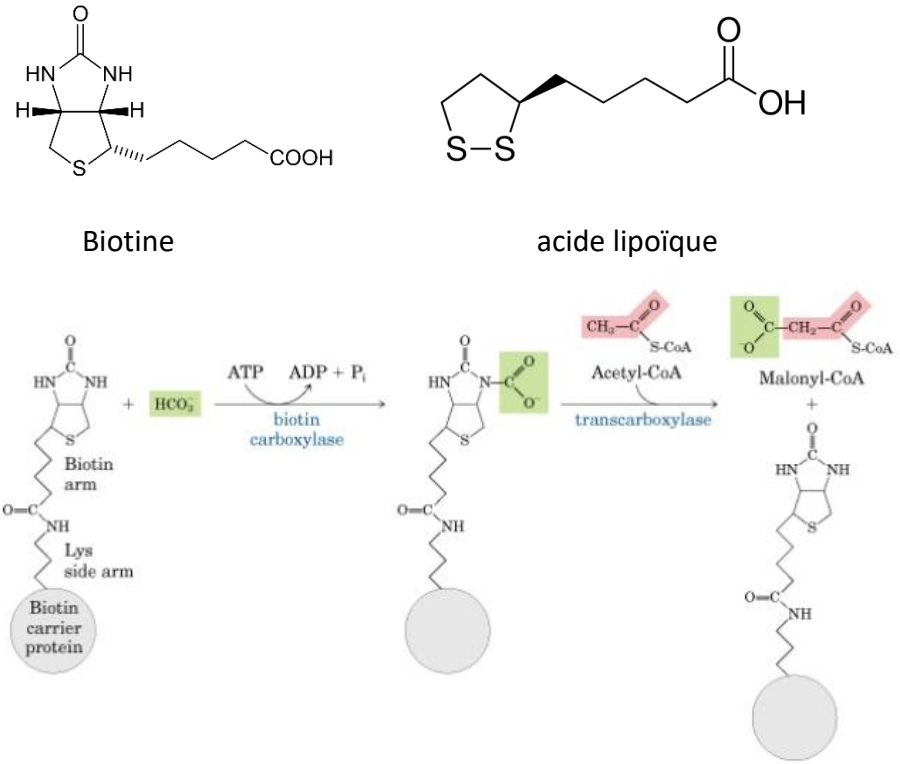


Fig. 34 : ***Formation de malonyl-CoA par une acetyl-CoA carboxylase (149).*** *Le malonyl-CoA utilisé au niveau de l'étape d'initiation nécessite la biotine pour sa synthèse. La biotine joue aussi un rôle régulateur sur accB.*

b) La régulation de la voie FASII

La synthèse des acides gras et de la membrane plasmique est énergiquement coûteuse pour la bactérie. En effet, la voie FASII utilise environ 32 moles d'ATP pour la synthèse d'une mole d'acide gras (112). Sans présence d'acide gras exogènes, afin d'optimiser son énergie et de s'adapter à son environnement, la bactérie va donc devoir réguler la synthèse des acides gras de manière précise. L'utilisation des acides gras exogènes peut faire économiser cette énergie. Les acides gras peuvent être catabolisés et donc utilisés comme sources de carbone. La voie de dégradation, appelée Fad pour « fatty acid degradation », a été mise en évidence chez *E. coli* et *B. subtilis*. Les acides gras sont dégradés par un processus appelé β-oxydation, pour former l'acetyl-CoA qui peut entrer dans le cycle acide citrique (TCA) ou bien réamorcer la voie FASII (150-152). *S. aureus* possède l'opéron *fad*, mais à ce jour, il n'y a pas de publications montrant son activité.

FapR est le répresseur transcriptionnel **de la voie FASII** et de la synthèse **des phospholipides** (112). FapR réprime les enzymes FabG, FabI, FabF, FabD, ainsi que PlsC et PlsX chez *B. subtilis* et *S. aureus* (153) (Fig. 35). La régulation par FapR est modulée par la quantité de malonyl-CoA et de malonyl-ACP (154,155). Le malonyl-CoA inhibe la fixation de FapR à une séquence d'ADN et permet la transcription des gènes *fap*. Lorsque FapR est surexprimé, les enzymes responsables de la synthèse des acides gras et des phospholipides sont réprimées (153,156,157). Ainsi, une supplémentation en acides gras exogènes ne suffit pas à restaurer la synthèse des phospholipides chez *S. aureus*.

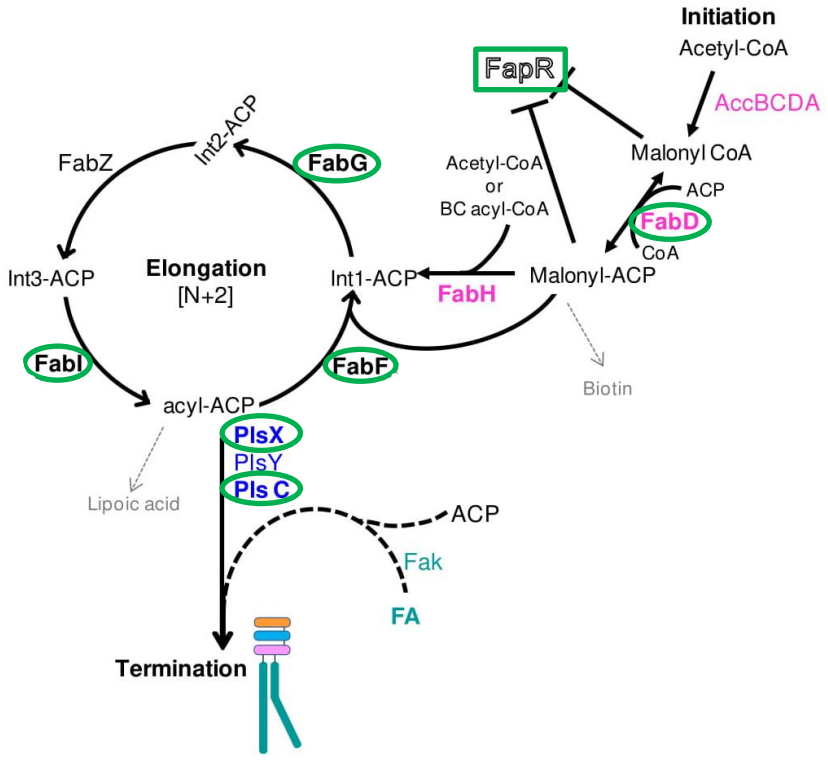


Fig. 35 : ***FapR est le régulateur principal de la voie FASII chez S. aureus.*** *FapR réprime les enzymes encerclées en vert. Chez E. coli, FabZ et PlsY semblent être régulés négativement par le ppGpp, ceci sera discuté dans la partie résultat (158). Image modifiée de (137).*

La voie FASII permet de synthétiser des acides gras variant en longueur de 12 à 22 carbones. Cette variabilité pourrait refléter une compétition pour des intermédiaires acyl-ACP entre l'enzyme de condensation FabF et l'acyl-transférase PlsX (141). La variation de la longueur des chaînes d'acides gras est dynamique (voir ci-dessous). Au fil de la synthèse et de l'allongement des acides gras, l'affinité va se déplacer en faveur des acyl-transférases (112). Chez *E. coli*, des acyl-ACP répriment la voie de FASII.

Autres régulateurs

La régulation de la synthèse des acides gras est aussi liée à des facteurs environnementaux, comme la quantité de nutriment dans l'environnement ou un changement de température (qui impacte la fluidité membranaire). Ces changements vont entraîner des modifications dans la quantité et la structure des acides gras produits. La modulation de la composition en acides membranaires par **FabF** dépend de la température chez *E. Coli* (138,141,159). Par exemple, lors d'une baisse de température, la fluidité membranaire est diminuée. Afin de remédier à ce problème, une synthèse des acides gras ramifiés va être favorisée afin de rendre la membrane de nouveau fluide. La fluidité est nécessaire pour que les interactions protéiques puissent se faire au niveau de la membrane.

FabH est la première enzyme de la voie FASII, et elle détermine la nature de l'acide gras qui est produit. Cette enzyme a une affinité plus importante pour des substrats ramifiés que pour l'acetyl-CoA, et en conséquence, favorise la synthèse des acides gras ramifiés (142,160).

Acyl-ACP/PlsX : Les acyls-ACP à chaîne longue inhibent les premières étapes de FASII chez *E. coli* mais cet effet n'a pas été démontré chez *S. aureus* (112). Ce « rétrocontrôle négatif » est aussi présent chez *S. pneumoniae,* et serait possible sur FabH et FabI, ce qui permettrait d'avoir la longueur des acyl-ACP souhaitée (141,161). L'inactivation de PlsX induirait l'arrêt de la biosynthèse des acides gras due à une accumulation des acyl-ACP (156). Nous allons voir plus loin que l'absence de PlsX pourrait être compensée par des acides gras exogènes.

Acc : Le complexe AccBCDA assure la première étape d'initiation de la synthèse des acides gras. Chez *E. coli*, la traduction d'AccDA est régulée par son produit. La traduction d'AccD est en relation avec la quantité de substrat dans l'environnement (138). AccD possède un doigt de zinc et inhibe la traduction d'*accDA* en se liant à l'ARNm. La synthèse de malonyl-CoA serait liée à la quantité d'acétyl-CoA. Lorsque l'acétyl-CoA se lie à l'AccD, l'ARNm de l'AccDA est libéré permettant la traduction. Ce motif est aussi présent chez *S. aureus,* et suggère une régulation similaire (138,162).

La biotine régule l'acc. La sous unité AccB est fonctionnelle lorsqu'elle est liée à la biotine. La quantité de biotine dans la bactérie va donc moduler la synthèse des acides gras (162).

Acides gras exogènes/FakA L'incorporation des acides gras exogènes dans des phospholipides bactériens nécessite une première étape de phosphorylation par la kinase FakA (136,163). La présence d'acides gras exogènes ne fait pas varier la quantité de malonyl-CoA et donc pas la synthèse des acides gras endogènes (141). Cette particularité a amené des auteurs à proposer que la continuité de la synthèse des acides gras endogènes indique qu'ils sont indispensables, et donc que les anti-FASII seraient une bonne cible chez *S. aureus* (141).

Lors d'une baisse de la température par exemple, si aucun changement n'est fait, la membrane va se rigidifier ce qui va réduire l'activité de certaines protéines membranaires, *S. aureus* doit donc augmenter la fluidité de sa membrane. Pour cela, la composition de la membrane doit changer et être composée d'acides gras à chaînes plus courtes et/ou augmenter la proportion d'acides gras *anteiso* (164). Chez *S. aureus* l'adaptation de la fluidité est possible par la modulation du lysyl-phosphatidyl-glycérol et de la cardiolipine (130,141). Outre les facteurs environnementaux de température ou la présence d'antimicrobiens, cette modulation est aussi présente en fonction du cycle cellulaire. Lors du cycle cellulaire, la composition en phospholipides régule l'initiation de la réplication de l'ADN chez *S. aureus.* Lors du cycle cellulaire la quantité de cardiolipine est modifiée (Cls 1 et Cls) (130,165). La cardiolipine est notamment responsable de l'adaptation aux fortes concentrations salines, un pH environnement faible, la baisse d'oxygène, le manque de nutriments etc. (130). Parmi les facteurs environnementaux auquels doivent faire face les bactéries, on peut noter le système immunitaire de l'hôte. En effet les antibiotiques ciblant la synthèse de la membrane vont impacter la synthèse de lysyl-phosphatidyl-glycérol (L-PG) ou encore de la cardiolipine (123,130). La cardiolipine est aussi modulée lors d'une phagocytose par des leucocytes polynucléaires (141). Cette régulation est constante. En effet, le taux des differents acides gras évolue beaucoup en fonction du type de milieu où les bactéries vont pousser (sans parler d'éventuelle molécules stressante comme les antibiotiques) (Fig 36).

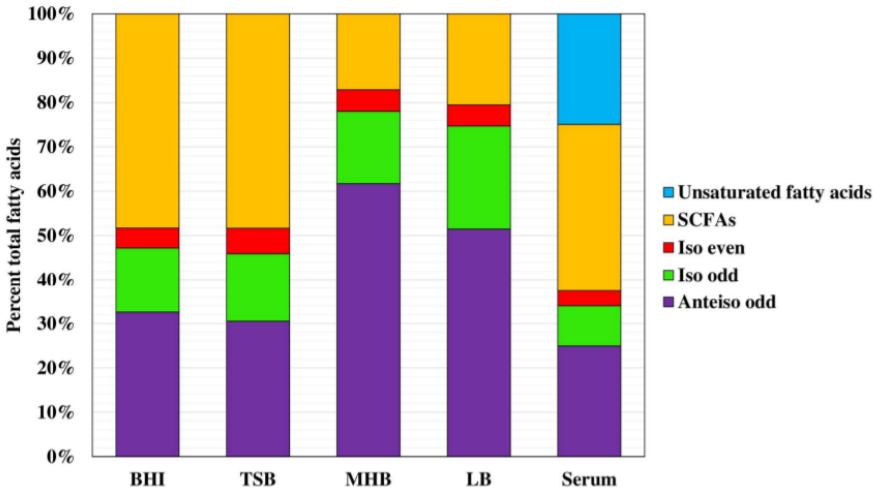


Fig. 36 : ***Composition en acides gras de la membrane plasmique de la souche JE2 en fonction des milieux de croissance utilisés (166).*** *La proportion des différentes formes d'acides gras change beaucoup en fonction des milieux utilisés. Il est notamment intéressant de voir la présence d'acides gras insaturés lors de l'utilisation de sérum (présent dans notre milieu d'étude).*

c) Acquisition et utilisation des acides gras exogènes

Il est actuellement bien documenté que les bactéries incorporent des acides gras de leur environnement. En effet, le sérum ou les acides gras présents dans le milieu permettent une croissance malgré la délétion de la voie FASII chez certaines bactéries (167). En revanche, la capacité de survivre exclusivement avec des acides gras exogènes peut dépendre de la bactérie. Le statut de *S. aureus* est resté controversé (162,168). Cette polémique est importante, car l'enjeu de l'utilisation des anti-FASII y est dépendant.

Les acides gras exogènes sont des sources potentielles d'énergie par i- la voie de β-oxydation codé par des gènes *fad* (pour fatty acid degradation) ou ii- leur prise en charge par FakA pour fournir des substrats nécessaires à la synthèse des phospholipides.

i- β-oxydation par la voie Fad : Comme noté ci-dessus, *S. aureus* possède les gènes codant les enzymes Fad, mais aucun rôle fonctionnel n'a pu être démontré (169). Cette voie transforme des acides gras libres en acyl-CoA (via Fad…), et comprend une série d'étapes de dégradation ayant un produit final d'acetyl-CoA. Ce produit pourrait ensuite rentrer dans les voies de synthèse des acides gras ou dans le cycle acide citrique TCA. Malgré la proposition que cette voie soit non-fonctionnelle, l'expression de l'opéron *fab* a été démontrée et varie selon des conditions de croissance (170).

i- Phosphorylation des acides gras par les enzymes Fak : Comme mentionné ci-dessus, *S. aureus* incorpore des acides gras exogènes saturés et insaturés après une étape de phosphorylation (Fig. 37). Ces acides gras incorporés peuvent être alors allongés dans le cycle FASII, et/ou utilisés dans la synthèse des phospholipides (136,163). Fak (pour Fak Acid Kinase) produit des acyl-PO_4 qui sont des substrats de PlsY, mais aussi de PlsX (136). FakA intéragit avec FakB1, qui dirige son activité vers des acides gras saturés, ou avec FakB2, qui favorise des substrats insaturés (136). Le rôle de FakA semble dépasser la phosphorylation des acides gras exogènes ; en effet FakA serait aussi un régulateur de facteurs de virulence et un régulateur négatif de la formation de biofilm (171).

La source principale d'acides gras chez l'homme est présente sous forme LDL (lipoprotéine). Il a été montré récemment que *S. aureus* doit sécréter les lipases Geh et Lip dans le milieu extracellulaire qui libèrent et rendent disponibles les acides gras du LDL (172).

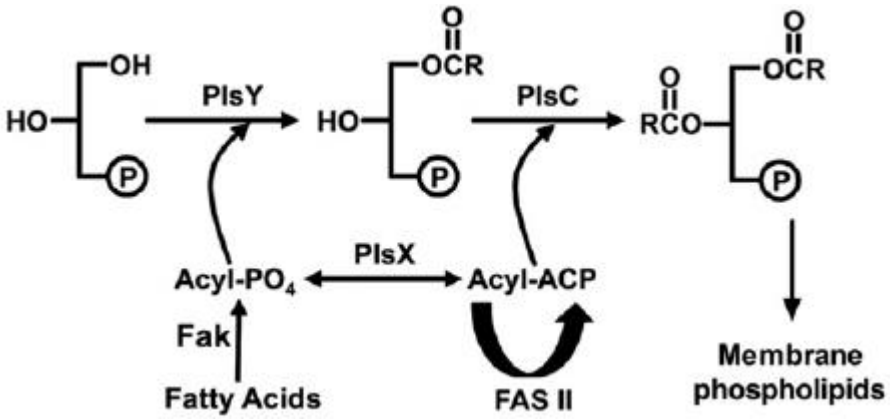


Fig. 37 : ***Les acides gras exogènes peuvent être utilisés après une phosphorylation par la kinase Fak****. Après cette étape ils peuvent être pris en charge par PlsY pour la synthèse des phospholipides ou par PlsX et entrer dans le cycle FASII chez S. aureus (136). La phosphorylation nécessite un système à 2 composants, FakA/FakB1 afin de prendre en charge les acides gras saturés et FakA/FakB2 pour les acides gras insaturés.*

Il semble admis par la communauté scientifique que les bactéries comme *S. aureus* peuvent incorporer des acides gras exogènes. En revanche, un débat est encore d'actualité concernant la capacité des acides gras exogènes de substituer les acides gras endogènes, particulièrement dans les phospholipides, étant donné que les acides gras produits naturellement par les bactéries ne sont pas entièrement retrouvés chez l'hôte infecté.

4) Les stratégies d'inhibition de la synthèse des phospholipides

Les acides gras sont essentiels au maintien de la survie des bactéries. C'est à partir de ce constat que la voie FASII est devenue une cible de choix pour lutter contre des bactéries pathogènes comme *S. aureus*. Cette voie à été désignée comme une bonne cible de par la différence avec la voie de synthèse chez les eucaryotes, appelée FASI et qui est un complexe protéique multifonctionnel. De plus, plusieurs enzymes de la voie FASII sont conservées entre les bactéries. Ces distinctions semblaient permettre le développement des anti-FASII ayant des spectres larges ou étroits, selon l'enzyme cible.

Toutes les enzymes de la synthèse de la voie FASII ont été considérées comme cible de molécules inhibitrices de par leur rôle essentiel dans la synthèse des acides gras. Malgré cela, 4 enzymes ont été principalement visées (Fig.38).

- Le complexe AccABCD qui synthétise le malonyl-CoA au début du cycle
- FabH responsable de la première étape d'élongation et permet de contrôler la quantité d'acide gras produit par la cellule
- FabF et FabI qui sont responsables de l'élongation des acyl-ACP

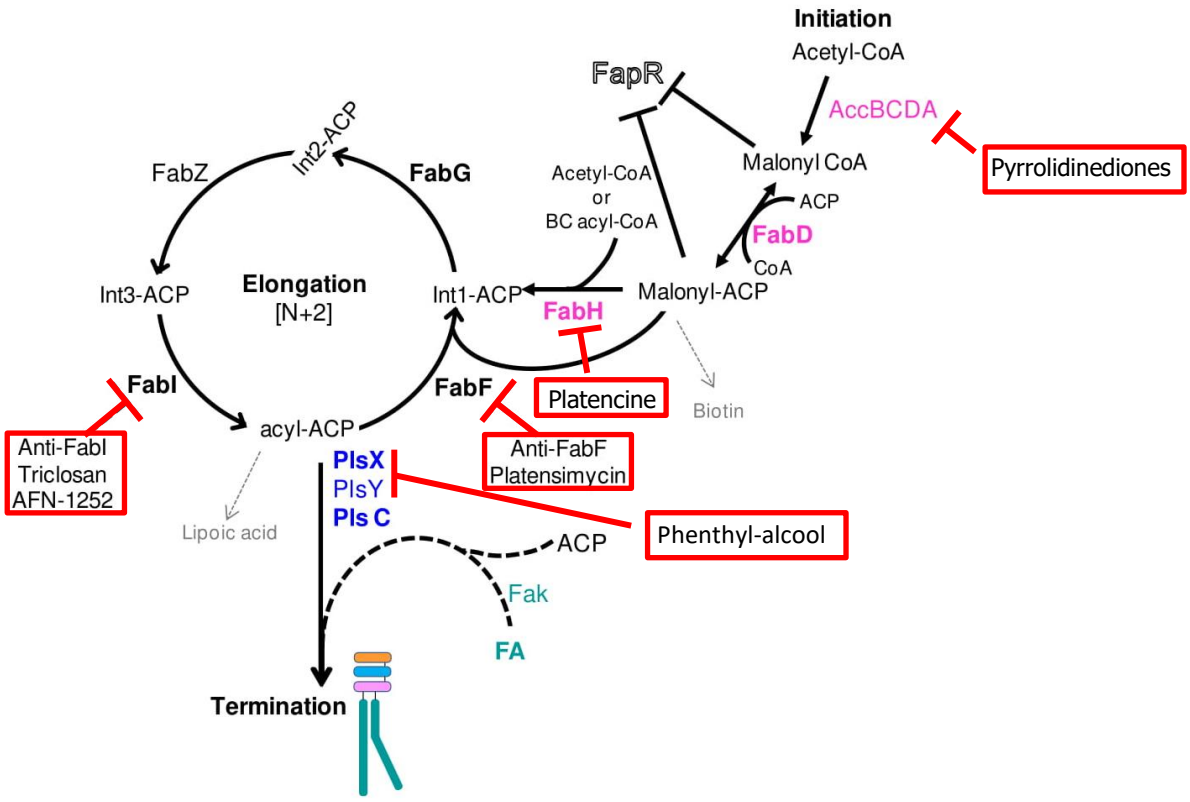


Fig. 38 : ***Exemple de cible et d'inhibiteurs de la voie FASII, il en existe pour toutes les enzymes de cette voie (voir tableau).***

La liste complète des anti-FASII connus à ce jour sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Cible	Inhibiteurs / remarques fonction connues
ACP/AcpS	**- Sch 538415** (173) **- 4H-Oxazol-5-one** (174) **- Acide anthranilique** (175,176)
ACC/AccABCD	**- Pyrrolidinediones (Moiramide B) :** cible spécifiquement AccAD (177). **- NCI 65828 chez** *Mycobacterium tuberculosis* (178) **- Andrimide** (177,179)
FabD	**-Corytubérine** (180) : cette molécule aurait un effet contre *H. pylori* (181).
FabH	**-HR12 (RWJ-3981)** chez *S. aureus* (182) **-Analogues d'indole (SB418001)** (183,184) **-1,2-Dithiole-3-ones** (185) **-Acides benzoylaminobenzoiques** (186,187) **-Platencine :** inhibe aussi un peu FabF **-Acides phomalleniques** ainsi que FabF : L'**acide phomallenique** C est décrit comme 20 fois plus efficace que la thiolactomycine et la cérulénine contre *S. aureus* (186). **-Sulfones cycliques** **-Alkyl-CoA-disulfides**
FabB/F	**-Céruléline :** se lie au site actif de l'enzyme lors d'une liaison au malonyl-ACP (160,188). **-Thiolactomycine :** joue le même rôle que la cérulénine en se liant au site actif cette fois vide (112). De nouveaux analogues sont en cours de développement (189). **-BABX** ne cible pas uniquement FabB/F, il empêcherait aussi la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines (190). **-Acides phomalleniques** (186,191) **-Fasamycines A et B** (192) **-Platensimycine :** cible FabF (et un peu FabH) (193,194) **-Dérivé de sulfamethoxazole** (195) Il est intéressant de noter qu'il existe aussi un effet croissant de la plantencine et de la platensimycine sur FabH alors que sa cible est FabF (196). Des effets non spécifiques ont pu être mis en évidence, ce qui pourrait permettre de traiter le diabète (197).
FabG	**-Polyphénols :** certains polyphénols présents dans le thé vert ciblent FabG et FabI (198)
FabZ	**-NAS-91 et NAS-21 :** ces molécules seraient actives chez *Mycobacterium tuberculosis in vitro* (199)
FabI	La liste des anti-FASII est longue, du fait que FabI a été la cible prévilégiée de la voie FASII. Le Triclosan et l'AFN seront décrits par la suite. Elles sont nos molécules d'études. **-Isoniazide** (200), **Ethionamide, Prothionamide, Triclosan, Diazoborine** (201), **Aminopyridines** (202,203), **Azétidines, Dedio-1452, Debio-1450, MUT-056399, CG-400549, CG-02390, Complestatine, Neuropectine A, Chloropeptine I, Imidazoles, substitués en position 1 et 4, Naptyridinones, Thiopyridines (GGTC-004061), Vinaxanthone Cephalochromine, Kalimantacine, Batumine, EGCG, Flavonoïdes, Méléagrine, GTG-330346**
phospholipides	**- Phenthyl-alcool :** perturbe les membranes en inhibant PlsB (204). **- Acyl-sulfamates :** effet sur PlsY et PlsX qui ne cause pas les mêmes problèmes que pour PlsB semble efficace contre *S. aureus* (205).

Tab. 4 : ***Résumé des anti-FASII disponibles*** *(116,188).*

Notre attention s'est portée sur les anti-FabI pour plusieurs raisons. Les anti-FabI sont les plus développés et les plus utilisés. Par ailleurs, il existe actuellement un anti-FabI en essai clinique de phase II (AFN-1252) qui est décrit comme prometteur (206). Notre étude a été réalisée à partir de 2 anti-FabI qui sont le **triclosan** et **l'AFN-1252**.

Le triclosan est une molécule largement utilisée aussi bien en thérapeutique qu'en usage courant. Ses effets sur un large éventail de bactéries l'a mené vers une utilisation courante déraisonnée (207). Il est utilisé comme additif dans les produits ménagers (sac poubelles anti-odeur), dans des produits d'hygiène du quotidien comme les savons, les crèmes de beauté et dentifrices. On la retrouve aussi dans des vêtements comme les chaussettes, des jouets pour enfants, et les équipements médicaux (208). Son utilisation intensive dans plus de 2000 produits différents (209) a fait qu'on retrouve cette molécule dans l'environnement (210), et dans l'urine de la majorité de la population américaine (211,212).

A de faibles concentrations, le triclosan inhibe spécifiquement l'enzyme FabI (207). Mais cette molécule a été généralement utilisée à de fortes concentrations (0,1 à 1%) (207). A ces concentrations le triclosan a un effet détergent non spécifique, et cause ainsi des trous dans les membranes des bactéries, et probablement, dans toutes les cellules.

Les nombreuses études sur les effets secondaires du triclosan (asthmes, allergies, problèmes musculaires ou encore cancérigène) ont mené à une diminution progressive de son utilisation (210,213-215). La FDA (Food and Drug Administration) a annoncé le 2 septembre 2016 l'interdiction partielle du triclosan aux Etats Unis. Il est interdit depuis le 1er janvier 2017 dans les savons. En revanche, elle ne s'applique pas encore aux dentifrices, gels hydro-alcooliques ou encore aux savons utilisés en milieu hospitalier. En 2017, 206 chercheurs ont lancé un appel pour le bannissement total du triclosan et du Triclocarban à cause de ses effets de perturbateur endocrinien (209). En effet, l'Union européenne interdit cette molécule seulement comme additif alimentaire et dans les matériaux au contact avec les aliments, mais on peut encore la retrouver dans les dentifrices (0,3%, savons, déodorants ou encore les bains de bouches à 0,2%). Ces différents appels au boycott mènent les industriels à ne plus utiliser cette molécule. La non utillisation de cette dernière devient de nos jours un argument marketing lorsqu'un dentifrice est commercialisé sans triclosan (216).

L'efficacité d'une molécule comme le triclosan fut importante pour lutter contre la dissémination des bactéries pathogènes. Mais aux doses utilisées, cette molécule pourrait avoir des conséquences néfastes pour la santé. C'est dans cette optique que de nouvelles molécules sont à l'étude, ayant la même cible que le triclosan (FabI) mais avec une spécificité plus importante (217-221).

Parmi ces nouvelles molécules certaines sont en essai clinique de phase II montrant l'intérêt que portent les industriels à utiliser ces molécules (Debio 1452, MUT-056399, CG-400549, CG 02390) (141,206,222-225). Une publication récente propose un modèle afin de designer de nouvelles molécules anti-FabI (226), ce qui reflète l'intérêt soutenu pour cette famille d'antibiotiques.

Supplementary Table 1. Summary of animal experiments testing the efficacy of anti-FabI against *S. aureus* infections.

Tested Component	MIC µg/mL	*S. aureus* strain	Animal Model	Protocol	Cohort	Measured parameters	Results	Reference
Aminopyridin compound 9	0.5	*S. aureus* ND	Rats	Groin infection in abscess Intraperitoneal drug injection 50 mg/kg (100 X MIC)	NA	ND	2.5 log CFU reduction	[1]
"Compound 4"	0.06	*S. aureus* WCUH29	Rats	Groin infection in abscess with 6.4 log10 CFU Oral or intraperitoneal drug administration 50 mg/kg (=850 X MIC) in 1 mL: 1, 4, 7 and 24 h post-infection	N = 5	CFU in the abscess 24 h post-therapy	3-4 log CFU reduction	[2]
AEA16 ene-amides with azetidines	0.06	*S. aureus* MRSA	CD-1 mice 20 g	Intraperitoneal injection of 2.5 10^8 CFU in physiological serum, 5 % mucin in 500 µL Oral drug administration in Tween 80, 1 h and 4 h post-infection	N = 6	Septicemia Survival % over 5 days	ED50: 0.9 mg/kg/j (15 MIC) > linezolid (ED50 2.8 mg/kg/j) used against MRSA	[3]
CG400549	0.25 0.5 in serum	*S. aureus* ATCC29213	Neutropenic mice	Intraperitoneal infection Oral drug administration 100 mg/kg (200 MIC) 6 h post-infection 3 times a day for 2 d	NA	Spleen CFU after 2 days	1.7 log10 CFU reduction	[4]
CG400549	0.25 0.5 in serum	*S. aureus* ATCC29213	Swiss mice	Intraperitoneal infection with 10^8 CFU Immediate oral drug administration of doses from 25 to 100 mg/kg	NA	Survival % over 3 days	100 % survival with 100 mg/kg (200 MIC) 40 % survival with 50 mg/kg (100 MIC)	[4]
Debio 1450 (AFN-1720)	16	*S. aureus* ATCC 29213	Mice	Intramuscular infection of posterior thigh with 5.9x10^5 CFU Oral drug administration 2 h post-infection in 5 % dextrose	NA	CFU from thigh 24 h post-therapy	ED50: 2.1 mg/kg	[5]
Debio 1450 (AFN-1720)	16	*S. aureus* ATCC 29213	Mice	Intramuscular infection of posterior thigh with 5.9x10^5 CFU Intravenous drug administration 2 h post-infection in 5 % dextrose	NA	CFU from thigh 24 h post-therapy	ED50: 4.5 mg/kg	[5]
Debio 1452 (AFN-1252)	0.015	*S. aureus* Smith	CD-1 mice female 20 g	Intraperitoneal infection with 35 X LD50 (LD50= 5 10^3) in 500 µL mucin. Oral drug administration 30 min post-infection	N = 5 X 3	Septicemia Survival % over 5 days	Infection kills in 24-48 h without treatment 50 % survival with 0.2 mg/mL (13 MIC) 100 % survival with 0.8 mg/mL (55 MIC)	[6]
Debio 1452 (AFN-1252)	0.015	*S. aureus* Wood46	CD-1 mice female 6-8 weeks (*i.e.* > 20g)	Sub-cutaneous infection in a 5 d granuloma pouch with 7.1 to 7.5 log10 CFU in 100 µL Oral drug administration of 100 mg/kg (6670 X MIC) after 2, and/or 26 and 50 h post-infection	NA	Pouch liquid CFU 48 h post-therapy TSA agar with 5 % active charcoal	Low effect for the first 12 h post-treatment 3 log CFU reduction in 24 and 48 h 5 log CFU reduction with 1 dose/day for 3 days Drug efficacy comparable to linezolid on rats	[7]
Debio 1452 (AFN-1252)	0.016	*S. aureus* ATCC 29213	Mice	Intramuscular infection of posterior thigh with 5.9x10^5 CFU Oral drug administration 2 h post-infection in 5 % dextrose	NA	CFU from thigh 24 h post-therapy	913 AUC0-24/MIC for 1 log dead bacteria	[5]
MUT056399	0.03 -0.12	MSSA (ATCC29213) MRSA VISA	Swiss mice female 6 weeks	Intramuscular infection of the thigh with 3.1 10^6 to 9.1 10^6 CFU Subcutaneous drug administration 1.5 h post-infection	N = 5	CFU from thigh 20 h post-infection Bacteriostatic dose determination	Bacteriostatic dose: 40-45.5 mg/kg/j (335 MIC) Drug efficacy same as linezolid in same model: 50 mg/kg/j	[8]
MUT056399	0.03 - 0.12	MSSA (ATCC29213) MRSA VISA	Swiss mice female 6 weeks	Intraperitoneal infection in 10 % mucin Subcutaneous drug administration 10 min post-infection	N = 6	Septicemia Survival % over 2 days	EDS0: 19.3 to 49.6 mg/kg/j (160-415 MIC)	[8]
Triclosan	ND	*S. aureus* SH1000	Rats	Gavaged with 1 mL of triclosan resuspended in corn oil at 100 mg/kg/d for 3 d Nasal infection 5 days later with 10^5 or 10^8 CFU	N = 5	Nasal CFU 7 days post-infection	Colonization enhanced by triclosan treatment	[9]
Debio 1452 (AFN-1252)	ND	*S. aureus* MSSA & MRSA	Humans male 19-64	Patients with wound infection / cutaneous abscess / cellulitis Oral drug administration of 200 mg immediate release tablets Twice a day up to 14 d	N ~ 100	Fever and skin infection area	20 % infection surface decrease in 3 d *S. aureus* detectable after 3 d > 90 % eradication rate at short and long term follow up Healing median time: 10 d No isolates with increased MIC post-treatment	[10]

Abbreviations are as follows: MIC: Minimal inhibitory concentration; ED50: median effective dose with effect on 50 % of the population; LD50, lethal dose killing 50 % of the population; Ref: Reference; NA: data not available; MRSA: Methicillin resistant *S. aureus*; MSSA: Methicillin sensitive *S. aureus*; VISA: Vancomycin Intermediate *S. aureus*.

Tab 5 : ***Tableaux résumant les essais in vivo des anti-FASII ciblant FabI pour traiter les infections à S. aureus réalisé par Claire Morvan dans la revue disponible en annexe*** *(227).*

Supplementary Table 2. Summary of animal experiments testing the efficacy of anti-FASII not targeting FabI to treat *S. aureus* infections.

Target	Tested Component	MIC µg/mL	*S. aureus* strain	Animal Model	Protocol	Cohort	Measured parameters	Results	Ref
ACC	Pyrrolidinedione compound 7	0.01	*S. aureus* ED133	Female CFW1 mice 20 g	Intraperitoneal infection with 10^6 CFU in 5% mucin 250 µL Intravenous or intraperitoneal drug administration in 200 µL 30 min post-infection	N = 5	Septicemia Survival % over 5 d	100 % survival with 25 mg/kg (2500 MIC; quantity 4 X higher than with linezolid)	[1]
ACC	Pyrrolidinedione compound 5	0.06 to 2	*S. aureus* ED133	Female CFW1 mice 20 g	Intraperitoneal infection with 10^4 CFU in 20 % mucin 250 µL Intravenous drug administration of 100 µL at 10 mg/kg (5X MIC) 30 and 90 min post-infection	NA	CFU in lungs, liver, peritoneum and blood after 5 h	Some compounds are close to linezolid efficiency but with 2 injections instead of 1 and on lower bacterial burden	[1]
FabF	Platensimycin	0.5 -2 in serum	*S. aureus* Smith	Mice	Intraperitoneal infection with 1.7 X 10^3 CFU Intravenous drug administration of 100 µg/h (60X MIC) for 24 h 30 min post-infection	N = 5 X 2	CFU in kidneys after 24 h	4 to 5 log CFU reduction 20 % kidneys without detected bacteria	[2]
FabF/H	Platencin	8 in serum	*S. aureus* Smith	Mice	Intraperitoneal infection with 4. 10^3 CFU in 500 µL mucin Intravenous drug administration of 150 µg/h (22X MIC) for 24 h 30 min post-infection	N = 7 with treatment N = 5 without	CFU in kidneys after 24 h Chapman plates	3 log CFU reduction in kidneys	[3]
FASII	Infectivity of FASII auxotroph *accD*	ND	*S. aureus* RN6930	Mice	Intraperitoneal infection with 10^6 CFU WT and 10^7 CFU for *ΔaccD* et *accC** in 100 µL mucin	N = 6 X 2	CFU in blood 24h post-therapy LB agar plates supplemented with FA and lipoic acid	10^6 WT CFU/mL *ΔaccD* and *accC** undetected	[4]
FASII	Infectivity of FASII auxotroph *fabD*	ND	*S. aureus* Newman *fabD*	Female BALB/c 6 week mice	Intravenous infection with 10^6 CFU	N = 6 X 2	CFU in liver and kidneys 2 d and 6 d post-infection BHI serum + FA in plates	3.5 log CFU reduction in liver and kidneys after 2 d Persistence in liver and kidneys after 6 d No difference with WT after 6 d in kidneys	[5]
FabF	Thiolactomycin analog TLM6	64	*S. aureus* MRSA BAA 1762	Swiss Neutropenic mice 6 week male 30 g	Intraperitoneal infection with 2.5.10^7 CFU Subcutaneous drug injection 1 and 25 h post infection with 100 mg/kg/injection	N = 6	Survival time	Average survival time of 3 d (compared to 5 d with vancomycin) ED50~125 mg/kg (compared to <30 mg/kg for vancomycin)	[6]

Tab 6 : ***Tableaux résumant les essais in vivo des anti-FASII ne ciblant pas FabI pour traiter les infections à S. aureus*** *(227).*

Les deux tableaux précédents mettent en avant le nombre important d'études *in vivo* concernant des anti-FASII contre *S. aureus*, et montrent à quel point la voie FASII a été considérée comme une cible thérapeutique.

Malgré ce nombre important d'études, les protocoles très variés ne permettent pas de comparer les résultats et de vérifier une réelle action. En effet, la disparité des infections étudiées est importante (intrapéritonéales, sous-cutanées, intramusculaires, inguinales...). Pour traiter les différentes infections, les méthodes d'administration sont elles aussi variées (orales, sous-cutanées, intramusculaires). Il est possible de douter de l'efficacité de certains traitements quand des drogues sont par exemple inoculées 10 minutes après l'infection, s'éloignant ainsi des traitements naturellement utilisés en clinique. Pour finir, les expérimentations animales sont parfois réalisées sur une faible quantité d'animaux limitant ainsi leur portée. Une uniformisation des protocoles permettrait de mieux comparer les résultats de ces essais.

IV) Contournement des anti-FASII

Les bactéries disposent de différents moyens afin de contourner l'inhibition des anti-FASII. Ce contournement peut se faire par un échappement de l'inhibition, par la mutation de la cible ou par une adaptation par une prise des acides gras exogènes qui vont remplacer les acides gras endogènes normalement synthétisés. Le contournement des anti-FASII nécessite une longue étape d'adaptation qui a été initialement appelée dormance avant la découverte du caractère actif de cette adaptation. Cet état sera présenté plus en détail dans la partie résultat.

1) Mutation de la cible

Ce type de contournement est la façon la plus commune de résister aux antibiotiques. Il s'agit de muter la cible de l'antibiotique ou d'avoir une mutation compensatrice ailleurs dans le génome. Des résistances au triclosan de ce type ont pu être mises en avant. La mutation dans FabI chez *S. aureus*, altéré dans le site de fixation de l'anti-FASII (M99T) permettrait une résistance au triclosan et au Debio-1452. D'autres mutations induisent aussi ce type de résistance avec d'autres molécules ciblant FabI (222). Un autre moyen trouvé par *S. aureus* de contourner les anti-FabI est l'augmentation de l'expression de *fabI* (observée chez des souches cliniques) (217,228,229). Cette augmentation de l'expression peut être due à une mutation au niveau de la région promotrice de *fabI* (230,231). *fabF* peut aussi être surexprimé lors de l'utilisation de platensimycine (160). Enfin, une mutation dans FabH peut aussi favoriser une résistance contre les anti-FASII ciblant FabF par une modification de l'expression de l'opéron et l'activité de FabF (160).

2) Adaptation par la prise des acides gras exogènes

Le deuxième type d'adaptation est dépendant des acides gras exogènes retrouvés dans le milieu. Dans ce cas, la bactérie va contourner le mécanisme d'inhibition par l'obtention des acides gras de l'environnement. Chez des bactéries Firmicutes comme des streptocoques et des entérocoques, les bactéries répriment leur propre synthèse par FASII en faveur des acides gras exogènes (167). Chez *S. aureus*, l'expression des enzymes FASII est toujours active en présence des acides gras exogènes, mais notre laboratoire a montré que cette bactérie arrive toutefois à contourner une inhibition. Ce type d'adaptation est l'objet de notre étude. Au cours des résultats nous allons décrire 2 nouveaux types d'adaptation par prise des acides gras exogènes.

a) Par mutation

Ce premier type d'adaptation est mutationnel. Au cours d'un blocage de la voie FASII, *S. aureus* va muter préférentiellement le gène *fabD,* ce qui permettrait une accumulation de la protéine ACP libre dans la cellule facilitant ainsi une meilleure prise des acides gras exogènes (article n°1).

b) Non mutationelle

Dans le deuxième article, un autre type d'adaptation est décrit. Il ne nécessiterait pas de mutation de la voie FASII. Au cours de cette adaptation, les bactéries montrent un phénotype atypique avec un problème dans la division cellulaire.

3) L'utilisation des anti-FASII est-elle compatible avec l'hôte ?

La similitude entre la voie FASII des procaryotes et la voie FASI des eucaryotes (ou encore la voie FASII mitochondriale) pose des questions sur d'éventuelles toxicités envers l'hôte. La Cérulénine n'est pas utilisable en clinique du fait de l'inhibition de la voie FASI dont elle est responsable (112).

A ce jour les différentes études sont contradictoires concernant l'utilisation des anti-FASII. La voie FASII a longtemps été décrite comme indispensable à la survie de *S. aureus*. (193,194,205,232). Les résultats qui vont être présentés par la suite vont répondre à la question « Est-ce que la voie FASII est essentielle à *S. aureus* ? » Lors de mon travail de thèse, nous avons déchiffré les stratégies utilisées par *S. aureus* pour échapper à l'inhibition par des antibiotiques anti-FASII. Nous ne pensons pas en revanche qu'il faut abolir les recherches et l'utilisation des anti-FASII. Une compréhension des mécanismes de résistances mis en place par la bactérie pour échapper à l'inhibition pourrait ouvrir des perspectives d'un traitement combinatoire. Par exemple, la piste d'une formulation composée d'un anti-FASII et d'une deuxième molécule ciblant le mécanisme d'adaptation semble donc à mes yeux une bonne piste pour contrer cette bactérie pathogène.

Une croyance encore forte concernant la sensibilité de *S. aureus* aux anti-FASII

Les principaux arguments mis en avant afin de « défendre » l'utilité des anti-FASII concerne i- la haute spécificité d'une enzyme de synthèse des phospholipides, PlsC, pour des acides gras ramifiés et ii- le besoin absolu de *S. aureus* pour ces acides gras ramifiés afin de maintenir l'homéostasie membranaire. Il a également été noté que les acides gras ramifiés ne sont que peu, ou pas présents chez les mammifères, et ne permettraient pas aux bactéries de proliférer *in vivo* (146). Ces arguments ont été utilisés pour soutenir le développement des anti-FASII afin de traiter des infections dues aux *S. aureus*.

RESULTATS

I) *Staphylococcus aureus* résiste aux anti-FASII en présence d'acides gras exogènes

1) En mutant le gène *fabD*

Afin de caractériser les mécanismes de résistances de *S. aureus* contre les anti-FASII, nous avons étudié la présence de mutations lors d'une supplémentation du milieu en acides gras. La présence d'acides gras exogènes dans le milieu augmente la fréquence de mutation du gène *fabD* de l'ordre de 100 fois. Ces mutations permettent une résistance contre les anti-FASII en présence d'acides gras exogènes par une accumulation de la protéine ACP intracellulaire. La meilleure disponibilité de l'ACP intracellulaire favorise la prise des acides gras exogènes *versus* la synthèse des acides gras endogènes. Après cette mutation, les bactéries n'ont plus besoin de leurs acides gras endogènes et vont utiliser les acides gras exogènes présents dans le milieu. Ce type de mutation permet de contourner une inhibition de type anti-FASII. Ces souches mutées sont toutefois toujours infectieuses chez le modèle de sepsis murin. Nous avons aussi montré qu'elles sont naturellement présentes dans différents biotopes, commensale et clinique. Cette présence montre un avantage compétitif *in vivo*. Ces résultats sont présentés dans l'article « Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targetet antimicrobials » publié le 5 octobre 2016 dans le journal Nature Communication.

Ma contribution à cette article fut principalement la mise au point et la réalisation des western blot permettant l'étude de l'ACP.

Article n° 1: Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 27 Sep 2015 | Accepted 16 Aug 2016 | Published 5 Oct 2016

DOI: 10.1038/ncomms12944 OPEN

Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials

Claire Morvan[1,†], David Halpern[1], Gérald Kénanian[1], Constantin Hays[2,3,4,5], Jamila Anba-Mondoloni[1], Sophie Brinster[2,3,4,†], Sean Kennedy[6,†], Patrick Trieu-Cuot[7,8], Claire Poyart[2,3,4,5], Gilles Lamberet[1], Karine Gloux[1] & Alexandra Gruss[1]

The bacterial pathway for fatty acid biosynthesis, FASII, is a target for development of new anti-staphylococcal drugs. This strategy is based on previous reports indicating that self-synthesized fatty acids appear to be indispensable for *Staphylococcus aureus* growth and virulence, although other bacteria can use exogenous fatty acids to compensate FASII inhibition. Here we report that staphylococci can become resistant to the FASII-targeted inhibitor triclosan *via* high frequency mutations in *fabD*, one of the FASII genes. The *fabD* mutants can be conditional for FASII and not require exogenous fatty acids for normal growth, and can use diverse fatty acid combinations (including host fatty acids) when FASII is blocked. These mutants show cross-resistance to inhibitors of other FASII enzymes and are infectious in mice. Clinical isolates bearing *fabD* polymorphisms also bypass FASII inhibition. We propose that fatty acid-rich environments within the host, in the presence of FASII inhibitors, might favour the emergence of staphylococcal strains displaying resistance to multiple FASII inhibitors.

[1] Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas 78350, France. [2] 'Barriers and Pathogens' Team, INSERM U 1016, Institut Cochin, Paris F-75014, France. [3] CNRS UMR 8104, Paris F-75014, France. [4] Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris F-75014, France. [5] Hôpitaux Universitaires Paris Centre Cochin-Hôtel Dieu-Broca, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris F-75014, France. [6] Metagenopolis-Micalis UMR 1319, Jouy en Josas 78352, France. [7] Biology of Gram-positive Pathogens Unit. Institut Pasteur 25-28 rue du docteur Roux, Paris 75015, France. [8] CNRS ERL3526, Paris 75015, France. † Present addresses: Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay 91400, France (C.M.); Society Lubro, Sevran 93270, France (S.B.); Pasteur Institute 25-28 rue du docteur Roux, Paris 75015, France (S.K.). Correspondence and requests for materials should be addressed to A.G. (email: alexandra.gruss@jouy.inra.fr).

Staphylococcus aureus is a remarkably versatile opportunist pathogen that has confounded the medical community by its ability to escape antibiotic inhibition. Multidrug-resistant *S. aureus* are a main cause of hospital- and community-acquired infections, and treatment constitutes a major medical and economic challenge[1,2]. The fatty acid synthesis pathway (FASII) has been a leading candidate as a novel essential target for antimicrobial discovery. Numerous FASII inhibitors are in the pipeline or in clinical trials, most of which target FabI, the enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (for example, AFN-1252 (now Debio-1452 and pro-drug Debio-1450), CG400549, CG400462 and MUT056399), or FabF, the β-ketoacyl-ACP synthase (for example, platencin, platensimycin and fasamycins A and B)[3–11].

Triclosan, a chemically synthesized biocide first introduced in 1965, is the best known FabI inhibitor developed thus far, and has had widespread use in hygiene, health care, and household products at concentrations of up to 1% (refs 12,13). In consequence, triclosan detection in human fluids is common, and has generated information on the limits of use of this anti-FASII, including safety issues[14–19]. Observed side effects of triclosan on the host may be caused by its general membrane-disrupting activity[12,17,19]. Additionally, triclosan-resistant staphylococci, conferred by mutations that maintain FASII activity, or obtained by horizontal transfer of the *Staphylococcus haemolyticus fabI* gene (encoding a naturally occurring resistant FabI variant), are estimated to comprise 5–15% of *S. aureus* clinical isolates[14,16,20]. Continued anti-FASII development is based on development of antimicrobials with greater FabI affinity and specificity that would curb its potentially dangerous side effects[4,9,21–24].

However, fatty acids are abundant in the host and can be used by several Gram-positive pathogens to overcome a FASII deficiency[25–28], which questions FASII targeting as a general strategy for antibacterial drug discovery. For example, exogenous fatty acids can fully compensate a FASII deficiency in *Streptococcus agalactiae*, and a FASII auxotroph was fully virulent in a murine septicaemic infection model[25].

Nevertheless, the ability of *S. aureus* to override FASII inhibition in the presence of fatty acids has remained in question[4,21,26,29,30]. *S. aureus* FASII expression is not blocked by exogenous fatty acids, whereas it is inhibited in streptococci[21]. Rather than synthesizing unsaturated fatty acids to fluidify their membranes (as do the streptococci), *S. aureus* synthesizes branched chain fatty acids, of which the main one, anteiso C15:0 (*ai*15:0), is apparently required for phospholipid synthesis[27,31,32]. Moreover, it has been proposed that FASII inhibition in *S. aureus* leads to accumulation of acyl-ACP intermediates, thereby limiting ACP availability for exogenous fatty acid utilization[9,27,33,34] (see Supplementary Figs 1 and 2 for pathway and genetic contexts). In addition, while fatty acid auxotrophs (defective in *acc* genes encoding acetyl-CoA carboxylase) are viable, optimal growth requires *ai*15:0, and these *acc* mutants are avirulent in a mouse septicaemic infection model[24,27,32].

The fundamental and medical importance of FASII-targeted drug development incited us to characterize *S. aureus* responses to anti-FASII drugs. Here we show that fatty acids, which are ubiquitous host constituents, can facilitate the emergence of *S. aureus* resistance to anti-FASII drugs.

Results

Fatty acids facilitate the emergence of triclosan resistance. Some Gram-positive bacteria can incorporate exogenous fatty acids, which enable resistance to anti-FASII drugs[25,26]. In the case of *S. aureus*, we considered the possibility that arising mutations could facilitate fatty acid incorporation and lead to FASII bypass, as hypothesized in an earlier study[27]. To reveal such fatty-acid-based triclosan resistant (FA-T^R) mutants, we examined the response of the *S. aureus* Newman strain to the FabI inhibitor triclosan on fatty-acid-containing BHI solid medium. A fatty acid cocktail (referred hereafter as 'FA') was used comprising C14:0, C16:0, and C18:1, which are present in the human host[35,36]. Overnight *S. aureus* BHI cultures were plated on medium containing FA and 0.25 μg ml^{-1} triclosan; as controls, they were also plated on medium without FA and/or triclosan. Triclosan-resistant colonies arose at about 100-fold higher frequencies ($\sim 10^{-6}$) in the presence of FA. The FA-T^R colonies were screened for growth on BHI, BHI-triclosan (BHI-T), BHI-FA and BHI-FA-triclosan (BHI-FA-T) plates (Supplementary Fig. 3). A minority of clones grew on all four media (FA prototroph triclosan resistant mutants, T^R mutants). The remaining clones grew either on BHI, BHI-FA and BHI-FA-T (FA prototrophs), or on FA-containing media but very poorly or not at all on BHI. The latter were thus considered as fatty-acid-dependent for normal growth and were designated DepT^R mutants. Fatty acids thus appear to facilitate the emergence of triclosan resistance in *S. aureus*.

Three classes of *S. aureus* FA-T^R mutants. Fatty acid profiles of randomly selected FA-T^R mutants (16 prototrophs and 20 DepT^R mutants) were determined from whole cell extracts of cultures prepared in BHI-FA-T medium. Representative profiles of each class of mutants are shown (Fig. 1). Among prototrophs, a minor class (3/16) comprised mutants with endogenous (EndoT^R) fatty acid profiles, indicating that the FASII pathway was active. The dominant class of prototrophs (13/16) comprised mutants having media-dependent fatty acid profiles, that is, with exogenous fatty acids in BHI-FA-T, and endogenous fatty acids in BHI (conditional triclosan-resistant mutants, referred to as CondT^R). Mutants of this class have not previously been reported. All the DepT^R clones showed poor or no growth on BHI plates, but displayed exogenous profiles in BHI-FA-T medium. These results show that the majority of isolated FA-T^R mutants were able to bypass a FASII block by incorporating exogenous fatty acids.

Gain of function in an *S. aureus* conditional mutant. Growth and fatty acid profiles of CondT^R-17 and the Newman strain were compared in the absence or presence of fatty acids and triclosan (Fig. 2a). Growth of both strains was comparable in BHI medium. The addition of fatty acids expectedly slowed strain growth, which was also comparable for both strains (Fig. 2a, centre)[37,38]. When triclosan was added, CondT^R-17 maintained growth, but not the Newman strain. Fatty acid profiles confirmed CondT^R strain capacity to bypass FASII inhibition and shift to the exogenous FA source (Fig. 2b). Thus, this conditional mutant can use exogenous fatty acids upon FASII block, while displaying normal growth otherwise.

Numerous FASII-bypass mutations map to *fabD*. Known *S. aureus* triclosan-resistant mutants carry mutations in the gene encoding FabI, the triclosan target: such mutant enzymes fail to bind triclosan but remain enzymatically active[12,14,16,24]. Our FA-T^R clones with EndoT^R fatty acid profiles resembled previously described strains carrying mutations in *fabI*[14,16]. The role of fatty acids in obtaining such mutants is unknown. In contrast, all tested mutants with exogenous fatty acid profiles (DepT^R and CondT^R strains) carried wild type *fabI* genes (Table 1).

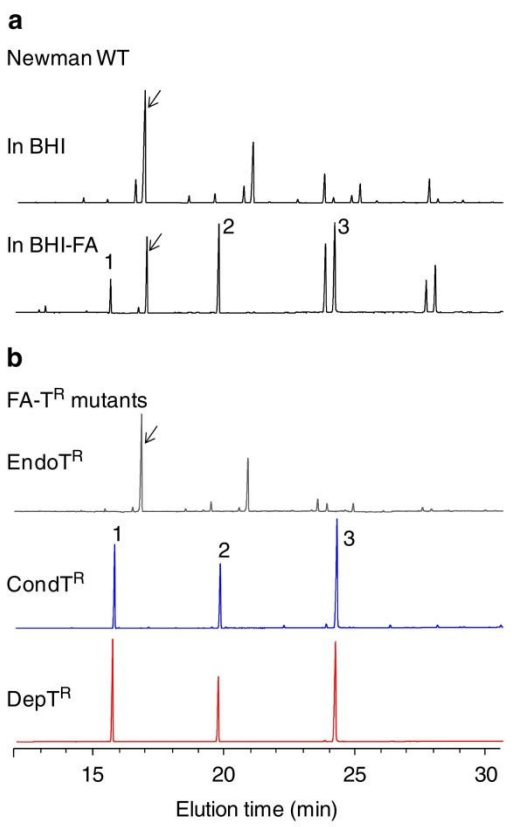


Figure 1 | *S. aureus* Newman WT and FA-T^R mutants use exogenous fatty acids. Fatty acid profiles are shown for (**a**) Newman strain (WT) cultures grown in BHI and BHI-FA and (**b**) FA-T^R clones grown in BHI-FA-T. *S. aureus* synthesizes branched chain fatty acids *de novo*, mainly C15:0 (*ai*15:0; indicated by arrow) and its elongation products, and saturated straight chain fatty acids. In BHI-FA, the WT strain uses exogenous fatty acids, but continues *de novo* synthesis. Peaks 1, 2, and 3 correspond to the exogenous fatty acids added during growth, respectively C14:0, C16:0, and C18:1 (collectively referred to as 'FA', see Methods). EndoT^R, FA-T^R with endogenous fatty acids (grey); CondT^R, FA-T^R with conditional FASII activity (blue), that is, active in BHI but bypassed in fatty acids plus triclosan; DepT^R, FA-T^R requiring exogenous fatty acids for growth (red). The fatty acid profile of the EndoT^R mutant was similar to that of the WT in BHI, while CondT^R and DepT^R profiles are exogenous.

Previously isolated *S. aureus* fatty acid auxotrophs mapped to FASII initiation genes *accC* and *accD*, encoding acetyl-CoA carboxylase subunits (biotin carboxylase and β-carboxytransferase respectively) for malonyl-CoA synthesis[27] (Supplementary Fig. 1). Among five tested DepT^R mutants, one (DepT^R-28) carried an *accB* mutation (Table 1).

Whole genome sequencing of one CondT^R and three DepT^R mutants revealed that these mutants carried *fabD* mutations as compared with the Newman parental strain (Table 1, sequenced strains are designated with '#'). CondT^R-17 bore a single nucleotide substitution generating FabD^{G196R}; DepT^R-5 carried a single nucleotide insertion that truncated FabD at amino acid position 8. No other mutation was detected in either strain. Strains DepT^R-45 and DepT^R-72 displayed single nucleotide deletions in *fabD*, and each carried a second mutated allele (Table 1), which mapped to either NWMN_0043 encoding conserved Staphylococcal Antigen 1b (Csa1b), one of a conserved family of 18 protein homologues[39] (for DepT^R-45), or NWMN_1735, encoding a DNA-repair-related protein[40] (for DepT^R-72). We chose to focus here on the singly mutated *fabD* strains. Sequencing *fabD* of other FA-T^R CondT^R clones revealed mutations mainly at position G196, and one at position Q265 (Table 1). FabD G196 is adjacent to key residues (positions 198 and 199) of the FabD active site based on *S. aureus* FabD crystallography[41]; it is possible that substitution by less flexible amino acids than glycine might impose constraints on FabD activity. The Q265P mutation is within a conserved region separating a helix from a β-strand as suggested from *Escherichia coli* FabD structure[42].

Thus, the majority of FA-T^R *S. aureus* mutants identified here contain mutations in *fabD* and utilize exogenous fatty acids to overcome FASII inhibition. Both *fabD* and *acc* intervene in FASII initiation (Supplementary Fig. 1), suggesting the importance of this first step in FASII bypass[27].

Diverse fatty acid combinations allow FASII bypass. Previous studies suggested that *ai*15:0 was strictly required at the second acyl position of the *S. aureus* phospholipid[24,27,32,43]. However, our results indicated that other fatty acids can replace *ai*15:0. We explored the possibility that a fatty acid of similar length, like C14:0 (33% of our FA cocktail), might substitute for *ai*15:0 when FASII was blocked (Fig. 3). The DepT^R-5 mutant was grown in medium containing triclosan and fatty acid cocktails with 33, 3 or 0% C14:0. For each cocktail, the amounts of C14:0 in *S. aureus* profiles reflected its proportions among fatty acids in the medium, indicating that C14:0 is not preferentially incorporated for FASII bypass.

A mix of the four principal fatty acids in human serum in physiological proportions (C16:0, C18:0, C18:1 and C18:2) was also tested. When added in purified form, the free fatty acid cocktail was toxic to staphylococci, likely due to C18:2 (linoleic acid), which makes up ~35% of serum fatty acids[35]. However, growth was restored when 10% delipidated serum was added, and DepT^R-5 displayed an exogenous fatty acid profile (Fig. 3e).

To mimic the within-host environment during infection, we grew *S. aureus* wild type and DepT^R-5 strains in medium containing sterile-filtered pig liver and kidney extracts. The incorporated fatty acids reflected those present in the medium (shown for liver; Fig. 3f, see Supplementary Fig. 4 for organ extract profile). Unexpectedly, long-chain unsaturated fatty acids C18:2 and C20:4 were efficiently incorporated. C16:0 was the shortest abundant fatty acid incorporated, indicating that DepT^R-5 *fabD* mutant growth was not dependent on *ai*15:0 or other short-chain fatty acids.

Thus, the *S. aureus fabD* mutant can use diverse fatty acids, including those available in the host, and can dispense with branched chain fatty acids. These results indicate that the composition of the *S. aureus* membranes can be more flexible than generally supposed[24,27,32,43].

Role of the *S. aureus fabD* allele in FASII bypass. To confirm that the *fabD* mutation is responsible for fatty acid dependency of DepT^R-5, the wild type *fabD* gene was cloned in expression vector pJ (resulting in pJ-fabD) and established in the mutant strain background. To simulate *in vivo* conditions and obtain insight into *S. aureus fabD* mutant behaviour in the animal host, tests were performed in medium supplemented with liver and kidney extracts as fatty acid sources. In non-supplemented medium, the pJ-fabD plasmid restored *ai*15:0 synthesis and growth to the DepT^R-5 strain, confirming that the *fabD* mutation was responsible for the FASII defect (Fig. 4a). Importantly, growth of DepT^R-5 (pJ) in host organ extracts was comparable to that of the Newman (pJ) strain, indicating that DepT^R-5 can grow robustly while using exclusively host fatty acids. In this condition, complementation with pJ-fabD also resulted in *ai*15:0 synthesis

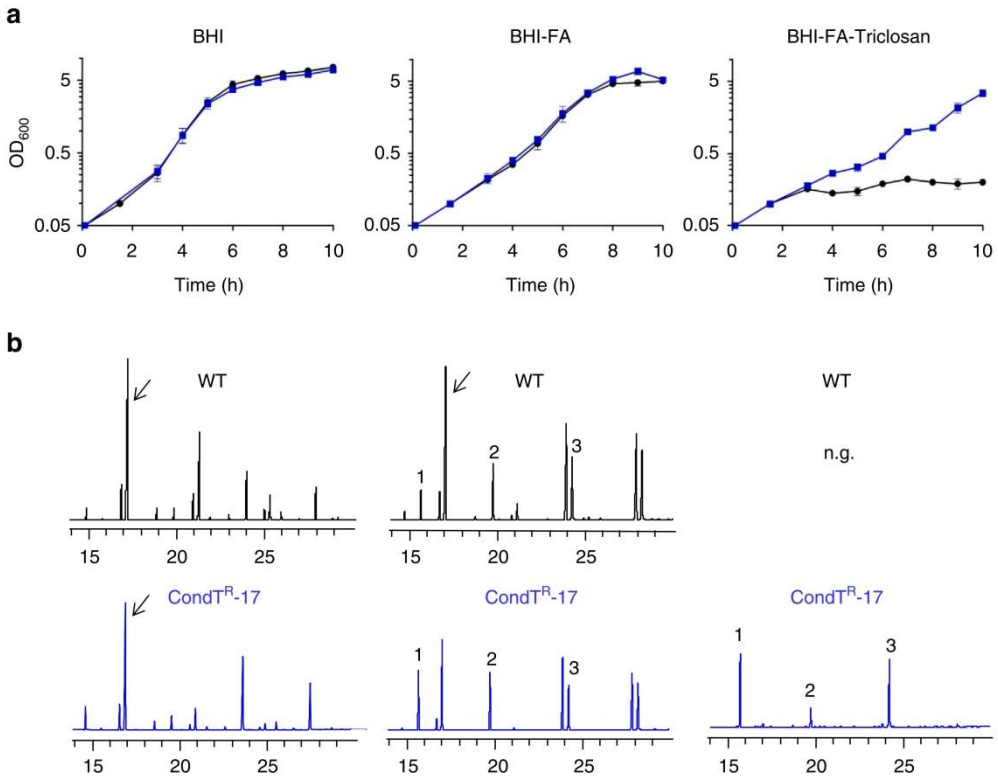


Figure 2 | Gain of function of the *S. aureus* CondT^R-17 mutant. (**a**) Growth of WT and CondT^R-17 (*fabD*^{G196R}) *S. aureus* strains in BHI, BHI-FA and BHI-FA-T media. Results show the average and range of biologically independent duplicates. (**b**) Fatty acid profiles of one sample set, taken at the 10 h time point. Endogenous branched-chain fatty acid (*ai*15:0) is indicated with arrows. Fatty acids are: 1- C14:0; 2- C16:0 and 3- C18:1, the fatty acids comprised in BHI-FA-T medium. N.g., no growth. Black, WT; blue, CondT^R-17.

Table 1 | Characterization of FA-T^R mutants.

Strain	Fatty acid prototroph/dependent*	Fatty acid profile in FA-T†	Detected FASII mutation	Other mutations‡
Newman#	Prototroph	-	-	
EndoT^R-62	Prototroph	Endo	FabI^{A95V} Nt 977098 C→T	
EndoT^R-41	Prototroph	Endo	FabI^{I193N} Nt 977392 T→A	
CondT^R-1	Prototroph	Exo	FabD^{G196V} Nt 1250192 G→T	
CondT^R-4	Prototroph	Exo	FabD^{G196V} Nt 1250192 G→T	
CondT^R-7	Prototroph	Exo	FabD^{G196V} Nt 1250192 G→T	
CondT^R-83	Prototroph	Exo	FabD^{Q265P} Nt 1250399 A→C	
CondT^R-17#	Prototroph	Exo	FabD^{G196R} Nt 1250191 G→C	None detected
DepT^R-5#	Dependent	Exo	FabD$^{Trunc\ AA8+14AA\ tail}$ Nt 1249630 T insertion	None detected
DepT^R-45#	Dependent	Exo	FabD$^{Trunc\ AA\ 285}$ Nt 1250461 A deletion	NWMN_1735§ Nt 1935749 T deletion
DepT^R-72#	Dependent	Exo	FabD$^{Trunc\ AA289+3AA\ tail}$ Nt 1250471 A deletion	NWMN_0043§ Nt 56530 G deletion
DepT^R-28	Dependent	Exo	AccB^{D25Y} Nt 1603874 G→T	
DepT^R-71	Dependent	Exo	FabD$^{Trunc\ AA\ 147}$ Nt 1250042 C→A	

*Prototrophs retain fatty acid synthesis capacity; in the absence of fatty acids they display endogenous (Endo) profiles; in the presence of fatty acids and a FASII inhibitor, they display either endogenous (Endo) or exogenous (Exo) profiles. Fatty-acid-dependent (DepT^R) strains rely on exogenous fatty acids under all conditions.
†Fatty acid profiles were determined from cultures in BHI-FA-T (C14:0, C16:0 and C18:1, 0.17 mM each, and 0.25 μg ml^{-1} triclosan in BHI medium). # after strain names signify that strains were genome sequenced.
‡Other mutated genes were detected among the genome-sequenced isolates (strains designated with #).
§NWMN_1735 encodes a 978 AA ORF with partial similarity to DNA repair proteins[40]. A single nucleotide deletion (position 1935749) interrupts the ORF at position 428, adding a 5 AA out-of-frame tail. NWMN_0043 encodes Conserved Staphylococcal Antigen 1b, Csa1b, one of a conserved family of 18 protein homologues present in the Newman strain[39]. A single nucleotide deletion (position 56530) truncates the 256 AA ORF after position 82, with a 3 AA out-of-frame tail. All strains exhibiting exogenous fatty acid profiles encode wild type *fabI* loci. Nt, nucleotide; trunc, truncated.

(Fig. 4b). In triclosan plus host organ extracts, growth of DepT^R-5 (pJ-fabD) lagged slightly behind that of DepT^R-5 (pJ) (Fig. 4c, Supplementary Fig. 5a). The intermediate effect could indicate that triclosan exerts a counter-selective effect on the plasmid-carried *fabD* copy.

CondT^R-17 grew both without and with fatty acid supplementation, and as expected, strong phenotypic differences were not observed in CondT^R-17 complementation tests. The CondT^R-17 (pJ or pJ-fabD) strains grew like Newman (pJ) in host organ extracts (data not shown). However, as above, CondT^R-17 (pJ-fabD) displayed a slight growth retardation compared with CondT^R-17 (pJ) in fatty-acid-triclosan-containing media as shown in the presence of kidney extracts (Supplementary Fig. 5b). In view of the absence of other mutations in the

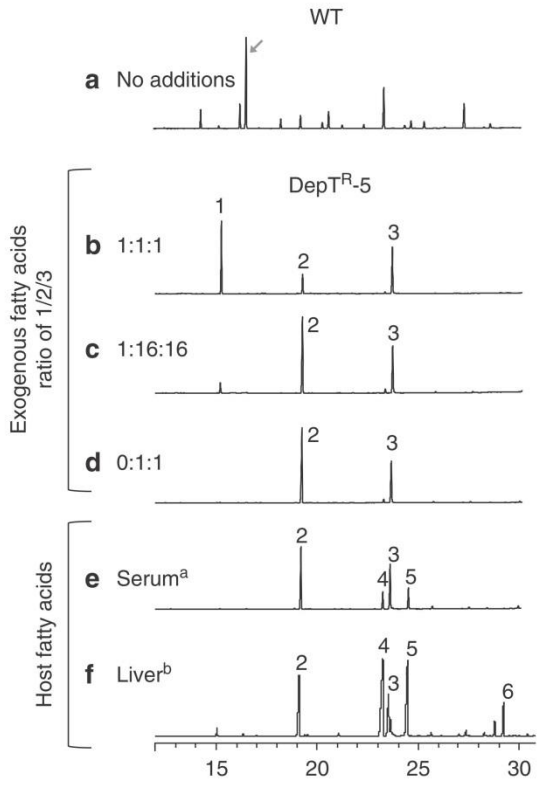


Figure 3 | A *S. aureus fabD* mutant uses diverse fatty acid combinations for FASII bypass. (**a**) Newman strain in BHI. (**b**–**f**) Cultures of DepT^R-5 were grown in BHI medium supplemented with triclosan and different fatty acid combinations and ratios, as indicated. Fatty acid profiles and OD_{600} were determined on cells harvested from 7.5 h (**a**–**e**) and 4.5 h (**f**) cultures. **a**, medium was supplemented with 10% delipidated serum, which lowered toxicity. **b**, Liver extract, prepared by sterile filtration, was added at a final concentration of 3% (without added fatty acids). The diagonal arrow indicates the position of *ai*15:0, the major fatty acid synthesized by *S. aureus*. Fatty acids are: 1- C14:0; 2- C16:0; 3- C18:1; 4- C18:0; 5- C18:2; 6- C20:4. Proportions of input fatty acids present in supplemented media are indicated at left. Fatty acid profile of liver extract is in Supplementary Fig. 4.

CondT^R-17 strain, the identification of other 'CondT^R' isolates mutated in *fabD* (Table 1), and the existence of *fabD* variants with FA-T^R phenotypes among clinical isolates (below), we consider that *fabD*^{G196R} is responsible for the CondT^R-17 conditional phenotype.

These results lead us to conclude that the *fabD* allele is responsible for the FASII defect in DepT^R-5 and CondT^R-17 strains. Both mutants grew comparably to the WT strain in host-simulated conditions, suggesting that these mutants would behave like the wild type strain in host compartments.

Cross-resistance of *S. aureus fabD* mutants to FASII inhibitors. AFN-1252 is a FabI inhibitor in clinical trials[44]; platensimycin is a FabF inhibitor and antimicrobial candidate[11]. Cross-resistance between triclosan and these drugs was tested. *S. aureus* Newman (WT) and *fabD* mutants DepT^R-5 and CondT^R-17 were plated on BHI or BHI-FA media. FabI inhibitors triclosan and AFN-1252, and the FabF inhibitor platensimycin were spotted on lawns (at 100, 100 and 16 times the respective minimal inhibitory concentrations (MIC)) (Fig. 5a–d). Triclosan- and AFN-1252-resistant colonies appeared within the inhibitory zones of the WT strain only on fatty-acid-containing plates (compare Fig. 5a,b). Platensimycin was poorly effective in both media at the tested concentration. We also noted a pronounced decrease in the inhibitory zone diameter for triclosan on BHI-FA compared with BHI plates (compare Fig. 5a,b). In contrast, both DepT^R-5 and CondT^R-17 strains grew, albeit more slowly, within inhibitory zones of the 3 FASII inhibitors on BHI-FA plates (Fig. 5c,d).

Cross-resistance was then checked for colonies isolated from WT BHI-FA plates as triclosan, AFN-1252 or platensimycin resistant (Fig. 5b). Colonies were patched on BHI-FA medium containing triclosan (0.25 μg ml^{-1}) or AFN-1252 (0.08 μg ml^{-1}) (Fig. 5e). Fatty acid profiles of colonies as determined on primary selections and cross-selections were all exogenous (not shown). In addition, liquid cultures of DepT^R-5 and CondT^R-17 confirmed the capacity of DepT^R-5 and CondT^R-17 to grow on platensimycin and incorporate exogenous fatty acids (Supplementary Fig. 6).

These results further support a role of fatty acids in facilitating *S. aureus* escape from anti-FASII inhibition, and show that mutants selected by the use of a FASII inhibitor can be resistant to other FASII inhibitors.

Infection by *S. aureus fabD* mutants. Infections by *fabD* DepT^R-5, *fabD* CondT^R-17 or the WT strain were compared in a mouse sepsis model. A low inoculum (10^6 CFU) was used to avoid the possibility of false-positive virulence assignments[32]. The conditional FA-T^R mutant, CondT^R-17, was as infective as the parental Newman strain and gave equivalent CFUs in both liver and kidneys (Fig. 6). These results indicate that this strain, and possibly similar variants, can retain full virulence.

The DepT^R-5 mutant showed delayed kinetics of infection. At two days post-infection, significantly lower CFUs were present in both liver and kidneys compared with the WT strain ($P = 0.001$ in both organs using the Mann–Whitney *U*-test). However, these differences narrowed at 6 days post-infection, particularly in kidneys, where DepT^R-5 CFUs increased and were not statistically different from WT CFUs ($P = 0.77$ in kidneys) (Fig. 6). Colonies issued from the 6-day infection were confirmed to maintain fatty acid growth dependency, and two colonies selected at random from each organ were confirmed to carry the original *fabD* mutation.

Our results indicate that both CondT^R and DepT^R mutants would resist challenge by a FASII inhibitor *in vivo*. As DepT^R-5 and CondT^R-17 also proliferate and incorporate fatty acids in the presence of AFN-1252 and platensimycin (Fig. 5c,d), we speculate that both types of mutants might override FASII inhibition regardless of the FASII inhibitor.

FASII bypass in natural isolates carrying FabD polymorphisms. Our results show that the CondT^R-17 G196R substitution correlates with FASII bypass *via* incorporation of exogenous fatty acids. We searched public databases for natural *S. aureus* isolates carrying FabD modifications at the G196 position, and found three such isolates. Two independent sputum and nare isolates carry FabD^{R196}: M0251 (a methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clonal complex CC5 isolate, BioSample accession code SAMN02325289) and M1532 (BioSample accession code SAMN02364048). The third strain, SA40, is a community- and epidemic-associated methicillin-resistant sequence type ST59 that was isolated from a healthy child and carries a FabD^{S196} protein. A closely related ST59 strain SA957 is an MRSA blood isolate that does not carry the FabD^{196} polymorphism[45]. These *S. aureus* isolates as well as two FAT^R mutants were tested for their capacity to bypass FASII. The three strains carrying FabD^{196} polymorphisms, but not the Newman or SA957 strains, showed FASII bypass on BHI-FA-T liquid medium, as verified by growth and exogenous FA incorporation (Table 2). These results further

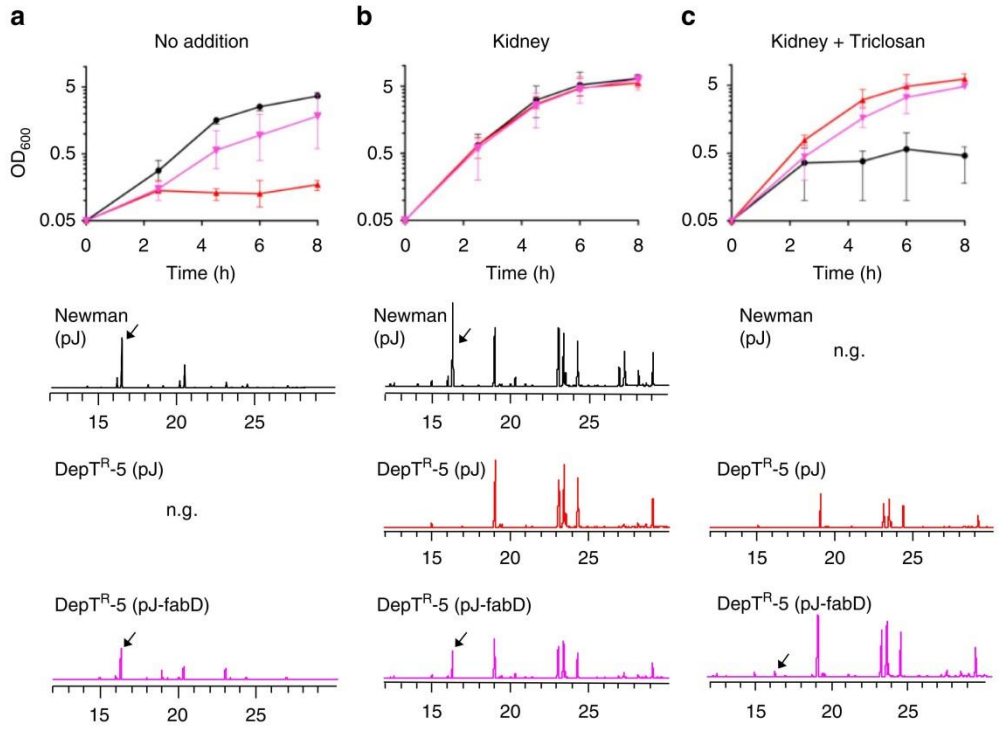


Figure 4 | Complementation of DepT^R-5 by the wild type *fabD* allele. Overnight LB-FA cultures of WT and DepT^R-5 strains carrying pJ (control plasmid), or pJ-fabD (expressing the *fabD* gene) were washed twice in LB, and cultures were inoculated at a starting $OD_{600} = 0.05$ in (**a**) LB (Cm 3 μg ml^{-1} and ATc 50 ng ml^{-1}), (**b**) the same medium containing sterile-filtered pig kidney extract (3% final volume) without or (**c**) with triclosan (0.5 μg ml^{-1}). OD_{600} was followed over 8 h. Fatty acid profiles were determined from harvested cells, as shown below the corresponding growth condition. N.g., no growth. Reference fatty acid profile and peak identification of kidney extract is in Supplementary Fig. 4. Growth results show the average with standard deviation of three experiments that gave comparable results (Supplementary Fig. 5). However, despite precautions, growth was variable between independent experiments, which may be due to the counter-selective effect of triclosan on the pJ-fabD plasmid.

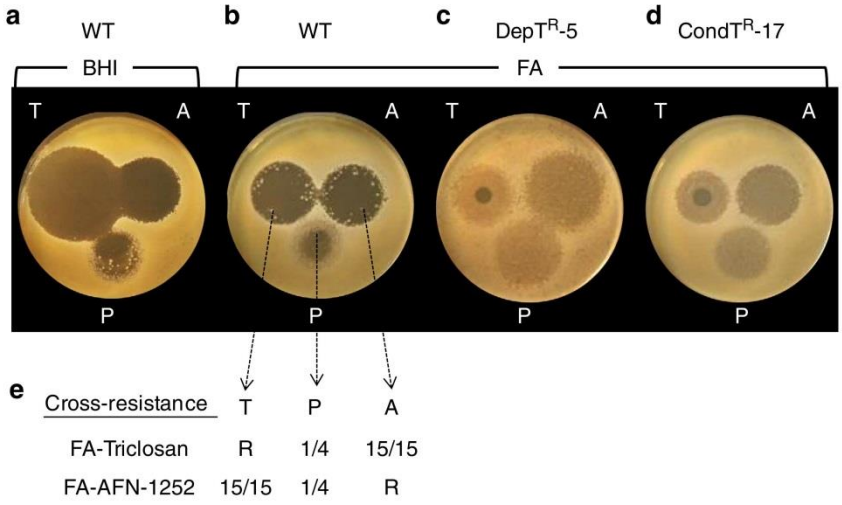


Figure 5 | *S. aureus* cross-resistance to anti-FASII drugs in the presence of exogenous fatty acids. Overnight BHI-FA-grown cultures of Newman WT, DepT^R-5, and CondT^R-17 were washed twice in BHI and plated on BHI solid medium without (**a**) (for Newman strain) or with fatty acids (**b**–**d**). Plates were spotted with triclosan ('T', 1.5 μg), AFN-1252 ('A', 1 μg), and platensimycin ('P', 8 μg), respectively 100, 100 and 16 times the MIC. Photographs were taken after 48 h at 37 °C. (**c**) DepT^R-5 and (**d**) CondT^R-17 strains accrue resistance to all three drugs on FA plates as seen by growth within the halo region, as compared with (**b**) the WT strain. The small inhibitory zone around triclosan is attributed to non-specific membrane effects[12]. (**e**) colonies that appeared within the inhibitory zones of WT strains on BHI-FA plates were cross-patched on BHI, BHI-FA, BHI-FA-AFN-1252 (80 ng ml^{-1}) and FA-triclosan (250 ng ml^{-1}). All colonies picked in fatty acids as triclosan-resistant were AFN-1252-resistant, and conversely. Fatty acid profiles (not shown) determined for colonies from each anti-FASII selective plate were fully exogenous.

support the correlation between *fabD*^{196} polymorphism and anti-FASII resistance, and show the capacity of *S. aureus* human isolates to use exogenous fatty acids to overcome FASII inhibitors. They also indicate that anti-FASII-resistance is present in some commensal and clinical isolates.

Redistribution of acyl-ACP pools in *fabD* variants. FabD catalyses the transfer of malonyl from malonyl-CoA to acyl-carrier proteins (ACPs), yielding malonyl-ACP (Supplementary Fig. 1). We considered that FabD polymorphisms near the active site (that is, position 196) might lower the efficiency of this reaction, thus leaving free ACP available for exogenous fatty acid incorporation. Two strain pairs were used to test this hypothesis: Newman strain (*fabD*^{G196})–CondT^{R}-17 (*fabD*^{R196}) and ST59 clinical strains SA957 (*fabD*^{G196})–SA40 (*fabD*^{S196}). Cell extracts and culture supernatants were prepared from 4 h cultures in BHI-FA-T. Short- and long-chain acyl-ACP were assessed on Western blots of conformation-sensitive gels using anti-ACP antibodies[27,46]; fatty acid profiles of cell extracts were done in parallel (Fig. 7). A dithiothreitol (DTT)-treated extract of BHI-grown Newman strain was used to identify the migration position of free ACP[27,46,47].

Acyl-ACP species were redistributed in both *fabD* variants (CondT^{R}-17 and SA40) compared with respective reference strains. Short-chain acyl-ACP pools were decreased in both variant strains, which is consistent with a reduced FabD activity as hypothesized. In addition, the *fabD* mutants contain long-chain acyl-ACPs that are not detected in reference strains, and their fatty acid profiles (but not those of the reference strains) are fully exogenous. Certain fatty acids are known to induce ACP release from *S. aureus* cells[38]; however, we found that at 4 h, supernatants of all strains produced weak signals that did not differ significantly between strain pairs (Supplementary Fig. 7). Thus, we hypothesize that the FabD^{R196} and FabD^{S196} mutant enzymes may be less active than FabD^{G196}, allowing free ACPs to be loaded with exogenous long-chain fatty acids that can then be incorporated into membrane phospholipids.

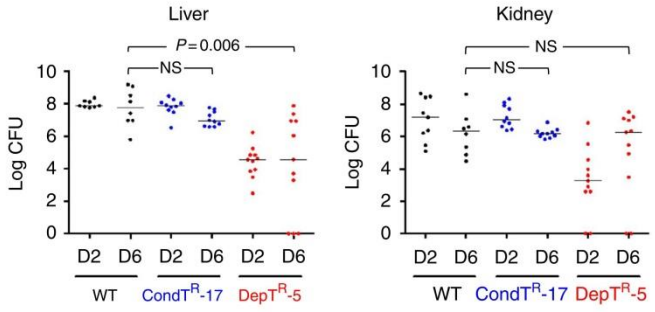


Figure 6 | Infection and persistence of *fabD* isolates in a mouse model. Newman WT (black), CondT^{R}-17 (*fabD* conditional; blue), and DepT^{R}-5 (*fabD* fatty-acid-dependent; red) strains were prepared. 10^{6} CFU were injected in the tail veins of 6-week female BALB/c mice (in groups of 8–11). In these experiments, one WT-infected and one CondT^{R}-17-infected mouse died 4 days post-infection. At days 2 (D2) and 6 (D6), animals from each group were sacrificed and dissected. Liver and kidney were homogenized by ultra-turrax and CFU per organ were determined by serial dilutions on BHI-FA plates containing 10% serum. Results are pooled from two independent experiments. Statistical tests were done using Mann–Whitney U to determine differences in CFU between groups on D2 and/or D6. No significant differences were observed between WT and CondT^{R}-17 in any test condition. Notably, no significant difference was observed between WT and DepT^{R}-5 CFUs in kidneys at D6 ($P=0.77$). NS, non-significant differences. The detection limit was 10^{2} CFU per organ; samples with no CFUs were plotted as '0'. In DepT^{R}-5 samples, one mouse showed no detectable counts in liver or kidney.

Discussion

The present work shows that a fatty-acid-rich environment can favour the emergence of *S. aureus* strains displaying resistance to multiple FASII inhibitors. Point mutations in *fabD* appear to facilitate FASII bypass by enhancing incorporation of exogenous fatty acids. Conditional (CondT^{R}) *fabD* mutants can grow normally, and can also bypass FASII in the presence of exogenous fatty acids, which suggests that they might be able to spread successfully in environments such as host organs. The *S. aureus* *fabD* mutants can use various fatty acid combinations (Fig. 3). This flexibility indicates that, contrary to previous assumptions[24,27,43], the branched-chain fatty acid requirement in *S. aureus* is not strict, as shown here for *fabD*^{196} variants in laboratory and clinical strains from major lineages (CC8, CC5 and ST59). It may also help survival of anti-FASII-resistant bacteria in different host compartments that vary in fatty acid composition. Therefore, we propose that all these factors need to be considered when developing anti-FASII drugs for treating *S. aureus* infection[4,5,8,10,11,48,49].

In FASII-bypass conditions, *fabD*^{196} variant strains show decreased levels of short-chain acyl-ACPs and increased levels of long-chain acyl-ACPs, in comparison with reference strains (Fig. 7). The decrease in short-chain acyl-ACP is consistent with our proposal that FabD^{196} variants may have reduced enzyme activity. We speculate that the detected long-chain acyl-ACP species correspond to exogenous fatty-acyl-ACP intermediates in phospholipid synthesis, which is consistent with the exogenous fatty acid profiles of *fabD*^{196} variants (Fig. 7). FASII bypass might depend on the outcome of competition for ACP between two

Table 2 | Natural clinical isolates bear *fabD* variants that favour FASII bypass.

Strain	Origin	FabD196 locus	Growth on		FA profile on FA-T
			BHI	FA-T	
Newman	Clinical-lab	FabD^{G196}	+ + + +	-	-
SA957	Blood	FabD^{G196}	+ + + +	-	-
SA40	Nare	FabD^{S196}	+ + + +	+ + + +	Exo
MO251	Sputum	FabD^{R196}	+ + + +	+	Exo
MO1532	Nare	FabD^{R196}	+ + + +	+ + + +	Exo
CondT^{R}-4	FAT^{R}	FabD^{V196}	+ + + +	+ + +	Exo
CondT^{R}-17	FAT^{R}	FabD^{R196}	+ + + +	+ + +	Exo

The NCBI database was searched for natural *S. aureus* isolates bearing FabD proteins with residues other than G196. Three such strains were received: CC5 isolate M0251, M1532 (Brigham and Women's Hospital, Boston; Mary Delaney and Michael Calderwood), and ST59 strain SA40 a Taiwanese commensal strain (Götz and Stemmler;[45]). ST59 strain SA957, whose *fabD* is identical to that of SA40 except for position 196, was used as reference for SA40 (Götz and Stemmler[45]). All strains listed above were grown overnight in BHI, BHI-FA (not presented) and BHI-FA-T. Overnight OD_{600}: + + + + = 8 or above; + + + = 3–7.9; + + = 1 to 2.9; + = 0.5–1; − = no growth. Growth results were within this range in three biological replicates. Fatty acid profiles for all strains but Newman and SA957 were determined on BHI-FA-T. FA, fatty acid; FA-T, BHI-FA-T medium. Exo, exogenous fatty acid profile.

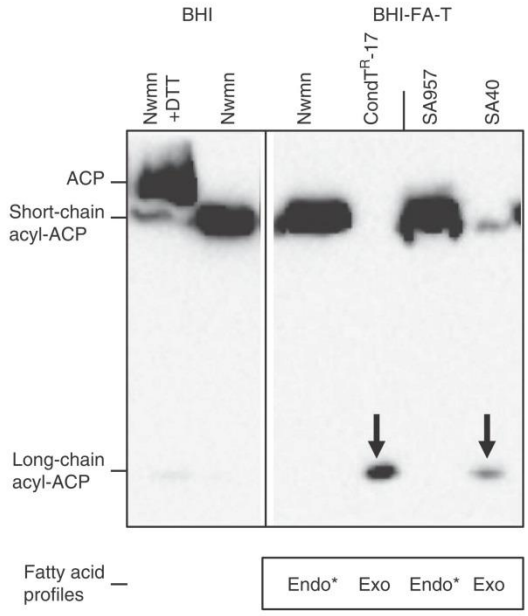


Figure 7 | Shift in ACP species in strains with *fabD*^{196} polymorphisms. The impact of an altered amino acid at FabD position 196 on acyl-ACP pools was tested by comparing strain pairs: Newman and CondT^R-17 (G196 and R196 respectively), and the ST59 pair SA957 (virulent) and SA40 (nasal isolate)[45] (G196 and S196 respectively). Extracts prepared from 4 h cultures in BHI-FA-T medium were run on conformation-sensitive gels. Anti-ACP antibodies were used to identify ACP moieties after gel transfer. In these gels, migration of acyl-ACP species increases with longer acyl chain length[46,66]. DTT treatment reduces acyl-ACP thioesters and releases free ACP[47]; the DTT-treated Newman protein extract from BHI-grown cells was used as migration control. Short-chain acyl-ACP is predominant in reference strains, and long-chain acyl-ACP moieties (arrows) are detected only in extracts of *fabD* variants. Results of fatty acid profiles of reference strains and *fabD* variants are indicated below respective lanes. Nwmn, Newman strain; *, fatty acid profiles derived from non-growing cultures. The Western is from a single gel with the same exposure, and results are representative of 3 biologically independent experiments. The Western blot shown above corresponds to the entire gel.

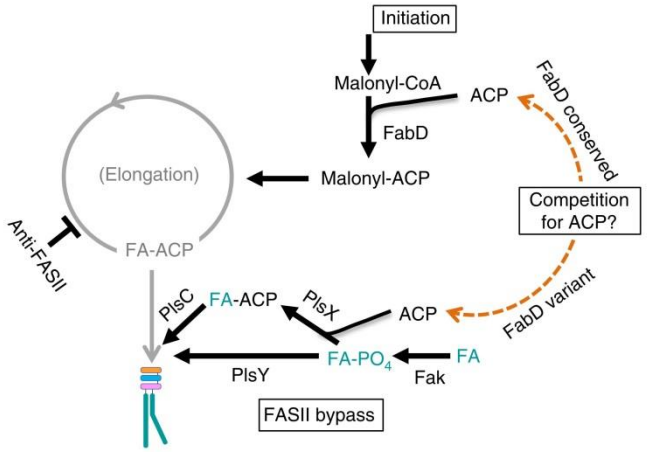


Figure 8 | Model of FASII bypass by *S. aureus fabD*^{196} variants based on competition for ACP. A role for FabD in ACP balance and as a determining factor of FASII bypass is proposed. Indicated pathways and regulatory functions are as previously identified[43,67]. In grey, the inhibited FASII elongation pathway. FASII initiation enzyme FabD uses ACP and malonyl-CoA to synthesize malonyl-ACP[50]. In FASII inhibitory conditions, PlsX would compete for ACP pools to convert exogenous fatty acids (turquoise) into phospholipids. Less efficient activity of FabD^{196} variants (Fig. 7) would leave ACP available for the PlsX reaction in the indicated direction (PlsX is a potentially reversible enzyme[43]), as indicated by orange dashed arrow. Fak-PlsY and Fak-PlsX-PlsC as proposed here, mediate acyl group joining respectively to positions 1 and 2 of the glycerol-3-phosphate (G3P) backbone[31,43]. FA, fatty acid; FA-ACP, acyl-ACP; FA-PO$_4$, acyl-phosphate.

enzymes at opposing ends of the pathway: the FASII initiation enzyme FabD (which uses ACP to synthesize malonyl-ACP) and the post-FASII termination enzyme PlsX (which catalyses the reversible formation of acyl-phosphate from acyl-ACP)[43,50]. Lower FabD activity would leave more ACP available for PlsX, to drive the reaction towards the synthesis of long-chain acyl-ACP (the phospholipid synthesis precursor) from exogenous fatty acids, and thus lead to FASII bypass (Fig. 8). At present, this or other roles for long-chain acyl-ACP, for example, in modulating FASII enzyme activities, need to be demonstrated.

Previous results showing that fatty acid auxotrophs carrying mutations in *acc* genes are avirulent led to the hypothesis that FASII-bypass mutants would not survive in the host[27,32]. In contrast, we have shown here that the *fabD* mutants DepT^R-5 and CondT^R-17 are infectious and persist in the host, and that clinical isolates chosen as bearing FabD^{196} polymorphisms can bypass FASII inhibition (Fig. 6 and Table 2). We speculate that this apparent discrepancy may be due to the different effects of the *acc* and *fabD* mutations on malonyl-ACP pools. FapR is a transcriptional repressor of FASII genes and of phospholipid synthesis genes *plsX* and *plsC*[51] (Supplementary Fig. 1). FapR activity is alleviated by malonyl-CoA[51–53]. Mutations in *acc* leading to reduced synthesis of malonyl-CoA would result in FapR-mediated repression of phospholipid synthesis. On the contrary, malonyl-CoA would not be affected in the *fabD* mutants; it is even possible that the *fabD* mutants may accumulate malonyl-CoA, thus alleviating FapR-mediated repression of phospholipid synthesis genes. This situation would favour FASII bypass in environments rich in fatty acids.

The present study uncovered *fabD* mutants as conferring a potentially non-deleterious anti-FASII escape strategy. It is possible that *fabD* mutations were not identified previously because of differences in experimental conditions, for example, in the choice of fatty acids and/or FASII inhibitors used in selections. Alternatively, strains might differ in their capacity to mediate FASII-bypass *via* mutations. Nevertheless, identification of *fabD* variant strains belonging to CC5, CC8, and ST59 groups and including MRSA isolates suggests that FASII-bypass variants may emerge in these dominant lineages.

Our study revealed that FASII bypass mutants need not be fatty-acid auxotrophs. The CondT^R mutant is resistant to several FASII inhibitors, yet grows normally and is infectious, indicating a gain of function. CondT^R-like variants may thus present a risk of dissemination in the environment. The three tested clinical and commensal isolates with *fabD*^{196} polymorphisms were all anti-FASII resistant (Table 2). Among them, differential anti-FASII resistance of closely related ST59 strains SA40 (resistant) and SA957 (sensitive) that differ in *fabD*^{196} further supports a role for *fabD* in FASII bypass among natural isolates. As FabD ORFs in genome-sequenced isolates are highly conserved within clonal types, we speculate that polymorphisms associated with FASII bypass arose by *in vivo* selection, possibly due to intensive use of triclosan in hygiene and household products[12]. A recent study of nasal secretions correlated the presence of triclosan with a greater incidence of colonizing *S. aureus* and consequent infection risk[18]. Interestingly, nasal secretions are fatty-acid-rich[54], and the presence of triclosan or other FASII inhibitors could select for high frequency FASII bypass. The CondT^R-like human nasal MRSA isolate (SA40) may be a case in point.

DepT^R-like mutants are also likely to be relevant to infection. Results presented here indicate that DepT^R-5 persists in the kidney over a six-day infection period (Fig. 6), indicating that these bacteria survive in the infected host. A recent study identified a FASII defect among clinical *S. aureus* small colony variants (SCV). SCV growth was restored to normal by fatty acid supplementation[55], strongly pointing to a DepT^R-like phenotype and implicating FASII bypass in chronic infection. Similar findings were reported for the opportunist pathogen *Enterococcus faecalis*[56]. Abscess formation during *S. aureus* infection is common, and it is tempting to speculate that this stage of infection may give privileged access to host fatty acids that support growth of both CondT^R and DepT^R mutants.

Fatty-acid-rich skin[36,57], possibly enriched by fatty-acid-containing skin products[58], may be an ideal medium on which FASII inhibitors would select for FASII-bypass-competent staphylococci. The selection strategy used in our study mimicked this situation. Emergence of versatile *S. aureus* FASII bypass variants upon anti-FASII treatment may generate a long-term risk for persistence and infection[59], requiring new rounds of antimicrobial therapy.

Methods

Bacterial strains and growth conditions. Experiments were performed using the *S. aureus* Newman strain[60]. SA40 (an Asian-Pacific nasal ST59 MRSA isolate from a healthy child) and SA957 (a virulent Taiwan ST59 blood isolate) were kindly provided by Freidrich Götz and Regine Stemmler (U. Tübingen, Germany)[45]. The M0251 (MRSA, clonal complex CC5) and M1532 strains are respectively nasal and sputum isolates that were generously provided by Mary Delaney and Michael Calderwood, and are part of the Brigham and Women's Hospital collection (Boston, USA). Plasmid cloning and extraction were performed in *E. coli* strains Top10 (Invitrogen, France) and MG1655 (ref. 61). BHI and LB media were used for *S. aureus*, and LB for *E. coli* growth. The fatty-acid mixture (referred to as 'FA') comprises C14:0 (myristic acid), C16:0 (palmitic acid), and C18:1 (oleic acid); 100 mM stocks in dimethylsulphoxide (DMSO) of each fatty acid were mixed at a 1:1:1 ratio, and then diluted 1:200 for use in liquid or solid medium. Other fatty acid mixtures were prepared similarly, such that the final molar concentration of fatty acids was 0.5 mM (that is, 0.17 mM each fatty acid). All fatty acids were from Larodan Fine Chemicals (Sweden). Newborn calf serum (Sigma-Aldrich, France) and delipidated calf serum (Eurobio, France) were added to growth medium (10% final concentration) as indicated. Triclosan (Irgasan; Sigma-Aldrich) was routinely used at 0.25 μg per mL in liquid cultures; this is 15 times the MIC for *S. aureus* Newman strain in BHI medium. Platensimycin (Tebu-Bio, France) and AFN-1252 (MedChem Express) were used respectively at 2 μg ml^{-1} and 80 ng ml^{-1} as per published efficacies[11,27]. Anti-FASII drugs were prepared in DMSO.

Kidney and liver extracts from adult pigs (usually 6 months, purchased at a local butcher shop) were prepared as follows: 200 g of each organ were cut in 0.5 cm cubes, and resuspended in PBS (1:2 w-v). Samples were homogenized using an ultra-turrax and then centrifuged twice (4,000 g for 30 min) to remove solid material. Supernatants were filtered through Whatman paper, recentrifuged at 20,000 g, and then sterile-filtered sequentially on 0.45 and 0.2 micron membranes. All steps were performed at 4 °C, and extracts were stored at −20 °C.

Selection for triclosan resistance on FA plates. Dilutions of overnight *S. aureus* Newman cultures were plated on four types of medium: non-selective (BHI); BHI plus FA (BHI-FA; FA are as described above); BHI with triclosan (BHI-T (0.25 μg ml^{-1})), BHI containing FA and triclosan (BHI-FA-T (0.25 μg ml^{-1})). Plates were incubated at 37 °C and scored at 48 h. Colonies were selected for phenotypic confirmation and characterization.

Colony forming units (CFU) on plates were compared with determine FA-T^R frequencies. Colonies that appeared on BHI-FA-T plates were then patched on the four plates as above to distinguish mutational phenotypes. Proportions of DepT^R and CondT^R mutants varied in independent experiments, possibly suggesting that slight variations in conditions may impact mutant phenotypes. Changes in fatty acid profiles of some FA-T^R isolates were observed upon FA-T selection, particularly after storage, suggesting that adaptation might occur during selection and/or storage. Care was therefore taken in analysing profiles directly from selective plates and before storage.

Determination of fatty acid profiles. Whole cell esterified fatty acid determinations were done essentially as described[62]. Briefly, 1–2 ml *S. aureus* cultures ($OD_{600} = \geq 1$) were centrifuged, washed once in 0.9% NaCl containing 0.02% Triton X-100, then washed twice in 0.9% NaCl. Cell pellets were treated with 0.5 ml of 1 N sodium methoxide. Heptane (200 μl) was then added, together with methyl-10-undecenoate (Sigma-Aldrich) as internal standard, vortexed for 1 min, and centrifuged. Fatty acid methyl esters were recovered in the heptane phase. Analyses were performed in a split-splitless injection mode on an AutoSystem XL Gas Chromatograph (Perkin-Elmer) equipped with a ZB-Wax capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm; Phenomenex, France). Data were recorded and analysed by TotalChrom Workstation (Perkin-Elmer). *S. aureus* fatty acid peaks were detected between 12 and 30 min of elution.

DNA sequencing. The *fabI*, *accABCD* and *fabD* genes of selected *S. aureus* Newman strain FA-T^R clones were sequenced. Primer pairs used for DNA amplification were: for *fabI*: FabIfd 5′-GATACAGAAAGGACTAAATCAAA-3′ and FabIrev 5′-TTTCCATCAGTCCGATTATTATA-3′ (ref. 20); for *accDA*: AccDAfd 5′-AACTAATGTATTGAATTGATGTAAACG-3′ and AccDArev 5′-AACATTCAACAGTCAAACGA-3′; for *accBC*: two sets were used AccBC1fd 5′-ACGGGTAGATGAAAACAAAC-3′ and AccBC1rev 5′-TCTTTTTCATCACG AGCAA-3′, and AccBC2fd 5′-AGTTGTTCCTGGTAGTGACG-3′ and AccBC2rev 5′-CCAGTGATGCCTTCGACTTC-3′; for *fabD*: FabDfd 5′-GAAGGTACTG TAGTTAAAGCACACG-3′ and FabDrev 5′-GCTTTGATTTCTTCGACTAC TGCTT-3′.

Whole genome sequencing was done on DepT^R isolates DepT^R-5, DepT^R-72 and DepT^R-45, CondT^R mutant CondT^R-17, and our parental Newman strain. Libraries were prepared with genomic DNA using the Illumina MiSeq next generation sequencing system (IMGM, Germany). The 2 × 250 base pair reads were aligned and sequence variations were analysed using CLC Genomics Workbench 5.5.2 software (CLC Bio). SNPs were found when comparing our control Newman strain to that in the Newman reference sequence (GenBank Nucleotide accession code NC_009641). Only differences between our laboratory Newman strain and FA-T^R mutants were considered in genome comparisons.

Cloning of *fabD* and *acpP*. The *fabD* gene (locus NWMN_1140) and the *fabD*^{G196R} variant gene were PCR-amplified from chromosomal DNA prepared from the Newman strain using the forward primer fabD-tail-F (5′-ATAAGC CGGGGGATCCACTAATGAGTAAAACAGCAATTATTTTTCCGGG -3′) and reverse primer fabD-tail-R (5′-GCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGTTA GTCATTTTCATTC CATCCTTTCACATC-3′). Amplified DNA was cloned by Gibson assembly[63]. The vector, pJIM2246-ptetR[64], was amplified for *fabD* cloning using primers pJ-fabD-R (5′-CCCGGAAAAATAATTGCTGTTTTACTCAT TAGTGGATCCCCCG GCTTAT-3′) and pJ-fabD-F (5′-GATGTGAAAGGAT GGAATGAAAATGACTAACCCTTTAGTGAGGGTTAATTGC GCGC-3′). Ligations were initially transformed into *E. coli* Top10. After plasmid verification by DNA sequencing, plasmids with and without inserts were transformed by electroporation into *S. aureus* strain RN4220 (ref. 60), re-extracted and transformed into Newman WT and *fabD* mutants. Standard electroporation protocols were followed[65], except that DepT^R-5 competent cells were prepared in BHI medium containing 10% heat-inactivated newborn calf serum and FA.

The *acpP* gene (locus NWMN_1142) was cloned in plasmid pMalC4X (New England Biolabs) as a fusion to *mbp*. Briefly, *acpP* was PCR-amplified using forward primer 5′-GCGAATTCGAAAATTTCGATAAAGTAAAAGATATC-3′ and reverse primer 5′-GGGAAGCTTTTATTTTTCAAGACTGTTAATAA ATTTAAC-3′. The digested fragment was then ligated to EcoRI-HindIII-linearized pMalC4X, and cloned in *E. coli* TG1, giving plasmid pMalC4X-acpP.

Complementation tests. Overnight cultures of wild type and *fabD* mutant strains carrying plasmids pJ or pJ-fabD were used to inoculate cultures at a starting density of $OD_{600} = 0.05$, in the following media: (i) LB containing 3 μg ml^{-1} Cm and 50 ng ml^{-1} anhydrotetracycline (ATc), (ii) same as (i) plus 10% kidney extract and (iii) same as (ii) plus 0.5 μg ml^{-1} triclosan. Growth was monitored in three independent experiments. Growth lags of DepT^R-5 (pJ-fabD) in condition (iii) compared with DepT^R-5 (pJ), and of CondT^R-17 (pJ-fabD) compared with CondT^R-17 (pJ) were determined as a ratio in individual experiments, and plotted as the ratio of the OD_{600} values at different time points (Supplementary Fig. 5).

WT and *fabD* mutant resistance to FASII inhibitors. WT, DepT^R-5 and CondT^R-17 strains were grown overnight in BHI-FA, washed twice in BHI, and 100 μl of $OD_{600} = 0.1$ bacterial suspension were plated on solid BHI or BHI-FA medium to obtain a lawn. Triclosan (1.5 μg in 3 μl), AFN-1252 (1 μg in 3 μl), and platensimycin (8 μg in 4 μl) were spotted immediately after plating. Plates were incubated at 37 °C and photographed after 48 h. Colonies growing within the inhibition zone of the anti-FASII drugs were patched to BHI, or to BHI-FA media containing or not triclosan 0.25 μg ml^{-1}, or AFN-1252 0.08 μg ml^{-1}, and scored for growth after 48 h. Bacterial patches were harvested directly for fatty acid profile evaluation.

Mouse infection model. Overnight cultures of DepT^R-5, CondT^R-17 and WT strains were grown in BHI-FA containing 10% serum. The morning of infection they were diluted to obtain a starting $OD_{600} = 0.02$ (WT and CondT^R-17) and 0.04 (DepT^R-5). Cells were grown in the same medium to $OD_{600} = 1$, washed, and

resuspended in 0.9% NaCl to obtain 2×10^6 cells per mL, as confirmed by plating on BHI-FA plus 10% serum solid medium. Six-week female BALB/c mice (Janvier Labs, France) were injected in the tail vein with 10^6 cells in 500 µl 0.9% NaCl (8–11 animals per group). Animals were sacrificed at day 2 and day 6 (4–6 animals per time point) and dissected. Liver and kidneys were suspended in phosphate-buffered saline and homogenized with an ultra-turrax. CFUs were determined per organ type on BHI-FA plates containing 10% serum. DepT^R-5 and CondT^R-17 clones (20 for each mutant per organ), issued from day 6 platings, were randomly selected to verify fatty-acid-dependent and conditional phenotypes; conservation of the mutated alleles was further confirmed in two clones from each organ by PCR-sequencing. The presented data are pooled from animal studies performed as two independent experiments.

Statistical analyses. The Mann–Whitney *U*-test was used to evaluate whether differences in CFUs in mice infected by Newman or mutant derivatives were statistically significant. Differences were compared for day 2 or day 6 between Newman and mutant derivatives. Analyses were performed with GraphPad Prism Software Version 6.00 (GraphPad Software, USA). Statistical significance was given as *P* values.

Growth capacity of *fabD* clinical variants and mutants on FA-triclosan. Precultures of Newman, M0251, M1532, SA957, SA40, CondT^R-4, and CondT^R-17 strains were prepared in BHI medium, and used to inoculate BHI or BHI-FA-T medium at an initial $OD_{600} = 0.01$. Cell density was determined as OD_{600} measurements after 16 h growth. FA profiles were determined for cultures that reached OD_{600} values above 0.5, which was defined as the growth threshold. Experiments were repeated three times.

ACP assessment by conformation-sensitive gels. Anti-*S. aureus*-ACP antibodies were prepared using ACP purified from *E. coli* TG1 carrying pMalC4X-acpP. For this purpose, cultures were grown in LB ampicillin (100 µg ml^{-1}), and ACP-MBP expression was induced by IPTG 0.5 mM for 2 h during mid-exponential growth. The ACP-MBP fusion was recovered on a maltose resin and eluted with 20 mM maltose. The fusion protein was digested with Xa protease as per manufacturer's instructions (New England Biolabs). Purified ACP was recovered from polyacrylamide gel electrophoresis–SDS (PAGE–SDS) gels and used for rabbit antibody preparation (Covalabs). The antibody preparation was validated on purified ACP protein, and used at 1:15,000 dilution.

Conformation-sensitive (non-denaturing) gels were done as described[27,46]. Precultures of test strains were grown to $OD_{600} = 0.5$ in BHI medium at 37 °C. They were then split in equal aliquots, and further grown for 4 h in BHI or BHI-FA-T. Cultures were harvested for preparation of protein extracts as described[27] from the equivalent of $OD_{600} = 5$. DTT-treated extracts from BHI-grown *S. aureus* Newman were used as reference for the position of holo-ACP[27,47]. Samples (equivalent to $OD_{600} = 0.25$ in 10 µl) were loaded on 13% polyacrylamide gels containing 1 M urea, which were run at 100 volts for 3 h, and then transferred to PVDF membranes (0.2 µm; BioRad) for Western blotting and exposure using an ECL kit (Perkin-Elmer) as per supplier's instructions.

Ethics statement. Animal experiments were performed at the animal facilities of HUPC in strict accordance with European Union guidelines for handling of laboratory animals, approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at the University of Paris-Descartes (CEEA 34), registration number 14-077.

Data availability. Genome sequence data for DepT^R-5, DepT^R-72, DepT^R-45, CondT^R-17, and our parental Newman strain have been deposited in the European Nucleotide Archive and can be accessed at http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB11476. The authors declare that all other data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files, or from the corresponding author upon request.

References

1. Lowy, F. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: where is it coming from and where is it going? *JAMA Internal Med.* **173,** 1978–1979 (2013).
2. Uhlemann, A. C., Otto, M., Lowy, F. D. & DeLeo, F. R. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* **21,** 563–574 (2014).
3. Banevicius, M. A., Kaplan, N., Hafkin, B. & Nicolau, D. P. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of novel FabI inhibitor AFN-1252 against MSSA and MRSA in the murine thigh infection model. *J. Chemother.* **25,** 26–31 (2013).
4. Escaich, S. *et al.* The MUT056399 inhibitor of FabI is a new antistaphylococcal compound. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55,** 4692–4697 (2011).
5. Feng, Z., Chakraborty, D., Dewell, S. B., Reddy, B. V. & Brady, S. F. Environmental DNA-encoded antibiotics fasamycins A and B inhibit FabF in type II fatty acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **134,** 2981–2987 (2012).
6. Moir, D. T., Opperman, T. J., Butler, M. M. & Bowlin, T. L. New classes of antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12,** 535–544 (2012).
7. Park, H. S. *et al.* Antistaphylococcal activities of CG400549, a new bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* **60,** 568–574 (2007).
8. Park, H. S. *et al.* CG400462, a new bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) inhibitor. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30,** 446–451 (2007).
9. Schiebel, J. *et al.* Rational design of broad spectrum antibacterial activity based on a clinically relevant enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **289,** 15987–16005 (2014).
10. Wang, J. *et al.* Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with *in vivo* antibiotic properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104,** 7612–7616 (2007).
11. Wang, J. *et al.* Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* **441,** 358–361 (2006).
12. McMurry, L. M., Oethinger, M. & Levy, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **394,** 531–532 (1998).
13. Webster, J., Faoagali, J. L. & Cartwright, D. Elimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a neonatal intensive care unit after hand washing with triclosan. *J. Paediatr. Child Health* **30,** 59–64 (1994).
14. Bamber, A. I. & Neal, T. J. An assessment of triclosan susceptibility in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* **41,** 107–109 (1999).
15. Bhargava, H. N. & Leonard, P. A. Triclosan: applications and safety. *Am. J. Infect. Control* **24,** 209–218 (1996).
16. Brenwald, N. P. & Fraise, A. P. Triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Hosp. Infect.* **55,** 141–144 (2003).
17. Cherednichenko, G. *et al.* Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca^{2+} dynamics in striated muscle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109,** 14158–14163 (2012).
18. Syed, A. K., Ghosh, S., Love, N. G. & Boles, B. R. Triclosan promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *MBio* **5,** e01015 (2014).
19. Yueh, M. F. *et al.*The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2014).
20. Ciusa, M. L. *et al.* A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40,** 210–220 (2012).
21. Balemans, W. *et al.* Essentiality of FASII pathway for *Staphylococcus aureus*. *Nature* **463,** E3–E4 (2010).
22. Kaplan, N., Garner, C. & Hafkin, B. AFN-1252 *in vitro* absorption studies and pharmacokinetics following microdosing in healthy subjects. *Eur. J. Pharm. Sci.* **50,** 440–446 (2013).
23. Parsons, J. B. & Rock, C. O. Is bacterial fatty acid synthesis a valid target for antibacterial drug discovery? *Curr. Opin. Microbiol.* **14,** 544–549 (2011).
24. Schiebel, J. *et al. Staphylococcus aureus* FabI: inhibition, substrate recognition, and potential implications for *in vivo* essentiality. *Structure* **20,** 802–813 (2012).
25. Brinster, S. *et al.* Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. *Nature* **458,** 83–86 (2009).
26. Brinster, S. *et al.* Essentiality of FASII pathway for *Staphylococcus aureus*. *Nature* **463,** E4–E5 (2010).
27. Parsons, J. B., Frank, M. W., Subramanian, C., Saenkham, P. & Rock, C. O. Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108,** 15378–15383 (2011).
28. Zhu, L. *et al.* The two functional enoyl-acyl carrier protein reductases of Enterococcus faecalis do not mediate triclosan resistance. *MBio* **4,** e00613–e00613 (2013).
29. Kaplan, N. *et al.* Mode of action, *in vitro* activity, and *in vivo* efficacy of AFN-1252, a selective antistaphylococcal FabI inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56,** 5865–5874 (2012).
30. Parsons, J. B. *et al.* Perturbation of *Staphylococcus aureus* gene expression by the enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitor AFN-1252. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57,** 2182–2190 (2013).
31. Parsons, J. B. *et al.* Identification of a two-component fatty acid kinase responsible for host fatty acid incorporation by *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111,** 10532–10537 (2014).
32. Parsons, J. B., Frank, M. W., Rosch, J. W. & Rock, C. O. *Staphylococcus aureus* fatty acid auxotrophs do not proliferate in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57,** 5729–5732 (2013).
33. Coleman, J. Characterization of the *Escherichia coli* gene for 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsC). *Mol. Gen. Genet.* **232,** 295–303 (1992).
34. Parsons, J. B., Yao, J., Jackson, P., Frank, M. & Rock, C. O. Phosphatidylglycerol homeostasis in glycerol-phosphate auxotrophs of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **13,** 260 (2013).
35. Nakamura, T. *et al.* Serum fatty acid levels, dietary style and coronary heart disease in three neighbouring areas in Japan: the Kumihama study. *Br. J. Nutr.* **89,** 267–272 (2003).

36. Ni Raghallaigh, S., Bender, K., Lacey, N., Brennan, L. & Powell, F. C. The fatty acid profile of the skin surface lipid layer in papulopustular rosacea. *Br. J. Dermatol.* **166,** 279–287 (2012).
37. Greenway, D. L. & Dyke, K. G. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **115,** 233–245 (1979).
38. Parsons, J. B., Yao, J., Frank, M. W., Jackson, P. & Rock, C. O. Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **194,** 5294–5304 (2012).
39. Schluepen, C. *et al.* Mining the bacterial unknown proteome: identification and characterization of a novel family of highly conserved protective antigens in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **455,** 273–284 (2013).
40. Krishnamurthy, M., Tadesse, S., Rothmaier, K. & Graumann, P. L. A novel SMC-like protein, SbcE (YhaN), is involved in DNA double-strand break repair and competence in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **38,** 455–466 (2010).
41. Hong, S. K. *et al.* New design platform for malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase. *FEBS Lett.* **584,** 1240–1244 (2010).
42. Serre, L., Verbree, E. C., Dauter, Z., Stuitje, A. R. & Derewenda, Z. S. The *Escherichia coli* malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase at 1.5-A resolution. Crystal structure of a fatty acid synthase component. *J. Biol. Chem.* **270,** 12961–12964 (1995).
43. Parsons, J. B., Frank, M. W., Jackson, P., Subramanian, C. & Rock, C. O. Incorporation of extracellular fatty acids by a fatty acid kinase-dependent pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **92,** 234–245 (2014).
44. Hafkin, B., Kaplan, N. & Murphy, B. Efficacy and safety of AFN-1252, the first staphylococcus-specific antibacterial agent, in the treatment of ABSSSI, including patients with significant co-morbidities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60,** 1695–1701 (2015).
45. Chen, C. J. *et al.* Characterization and comparison of 2 distinct epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage. *PLoS One* **8,** e63210 (2013).
46. Cronan, J. E. & Thomas, J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol.* **459,** 395–433 (2009).
47. Masoudi, A., Raetz, C. R., Zhou, P. & Pemble, C. W. T. Chasing acyl carrier protein through a catalytic cycle of lipid A production. *Nature* **505,** 422–426 (2014).
48. Kaplan, N. *et al. In vitro* activity (MICs and rate of kill) of AFN-1252, a novel FabI inhibitor, in the presence of serum and in combination with other antibiotics. *J. Chemother.* **25,** 18–25 (2013).
49. Yum, J. H. *et al. In vitro* activities of CG400549, a novel FabI inhibitor, against recently isolated clinical staphylococcal strains in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51,** 2591–2593 (2007).
50. Ruch, F. E. & Vagelos, P. R. The isolation and general properties of *Escherichia coli* malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. *J. Biol. Chem.* **248,** 8086–8094 (1973).
51. Albanesi, D. *et al.* Structural basis for feed-forward transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **9,** e1003108 (2013).
52. Schujman, G. E., Paoletti, L., Grossman, A. D. & de Mendoza, D. FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Dev. Cell* **4,** 663–672 (2003).
53. Martinez, M. A. *et al.* A novel role of malonyl-ACP in lipid homeostasis. *Biochemistry* **49,** 3161–3167 (2010).
54. Do, T. Q. *et al.* Lipids including cholesteryl linoleate and cholesteryl arachidonate contribute to the inherent antibacterial activity of human nasal fluid. *J. Immunol.* **181,** 4177–4187 (2008).
55. Lin, Y. T. *et al.* Emergence of a small colony variant of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with septic arthritis during long-term treatment with daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **71,** 1807–1814 (2016).
56. Kubota, N. *et al.* First isolation of oleate-dependent *Enterococcus faecalis* small-colony variants from the umbilical exudate of a paediatric patient with omphalitis. *J. Med. Microbiol.* **62,** 1883–1890 (2013).
57. Nicolaides, N. Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science* **186,** 19–26 (1974).
58. Becker, L. C. *et al.* Final report of the amended safety assessment of myristic acid and its salts and esters as used in cosmetics. *Int. J. Toxicol.* **29,** 162S–186S (2010).
59. Fitzgerald, J. R. Evolution of *Staphylococcus aureus* during human colonization and infection. *Infect. Genet. Evol.* **21,** 542–547 (2014).
60. Herbert, S. *et al.* Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* **78,** 2877–2889 (2010).
61. Blattner, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277,** 1453–1462 (1997).
62. Yamamoto, Y. *et al.* The Group B Streptococcus NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Mol. Microbiol.* **62,** 772–785 (2006).
63. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6,** 343–345 (2009).
64. Lartigue, M. F. & Bouloc, P. A tetracycline-inducible expression vector for *Streptococcus agalactiae* allowing controllable gene expression. *J. Microbiol. Methods* **96,** 16–18 (2014).
65. Kraemer, G. R. & Iandolo, J. J. High-frequency transformation of *Staphylococcus aureus* by electroporation. *Curr. Microbiol.* **21,** 373–376 (1990).
66. Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J. G. & Ohlrogge, J. B. *In vivo* pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach. Evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **266,** 1858–1865 (1991).
67. Zhang, Y. M. & Rock, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6,** 222–233 (2008).

Acknowledgements

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) funding of the FattyBact project ANR-132101. C.M. was awarded a stipend from the French Ministry. We are grateful to Friedrich Götz and Regine Stemmler (Tübingen University), and Mary Delauney and Michael Calderwood (Bingham and Women's Hospital, Boston, USA) for providing *S. aureus* strains and information on their characteristics. We thank Philippe Bouloc (I2BC, Orsay, France), Mélanie Guillemet and MicrobAdapt team colleagues for stimulating discussions, and Anne Six and Asma Tazi for excellent technical help and advice.

Author contributions

C.M., D.H., G.K., J.A., C.H., S.B., S.K., G.L., K.G. and A.G. performed experiments. C.M., P.T.C., C.P., G.L., K.G. and A.G. designed experiments. C.M., D.H., G.K., J.A., P.T.C., C.P., G.L., K.G. and A.G. analysed data. C.M. and A.G. wrote the paper, with contributions from K.G., G.L., C.P. and P.T.-C. A.G. supervised the project.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

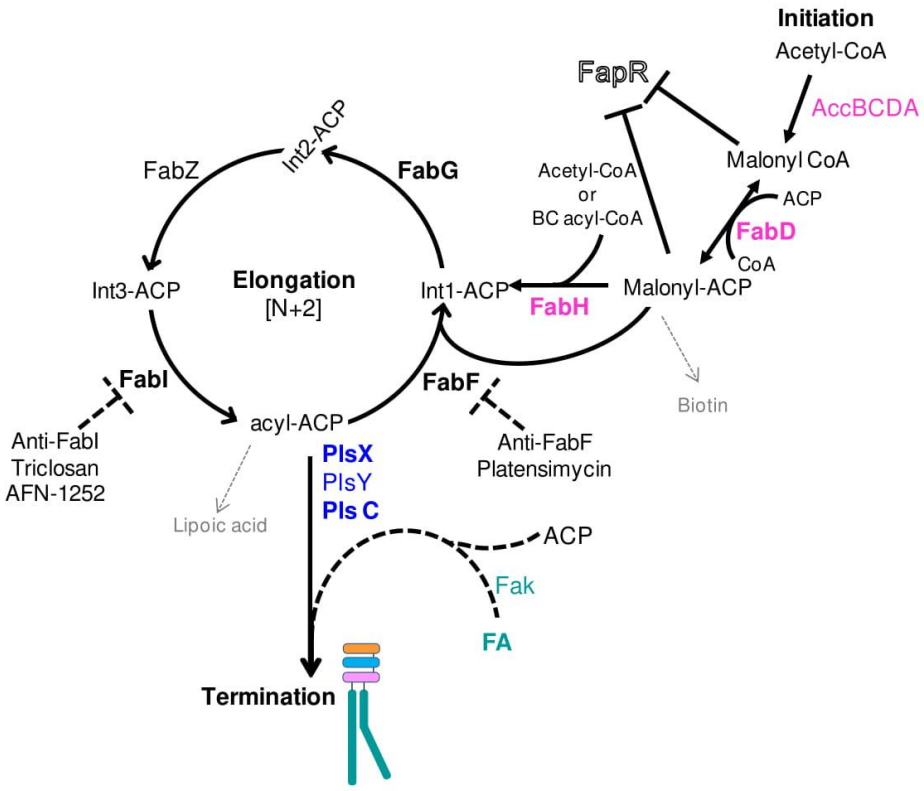
Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Morvan, C. *et al.* Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials. *Nat. Commun.* **7,** 12944 doi: 10.1038/ncomms12944 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2016

Supplementary data



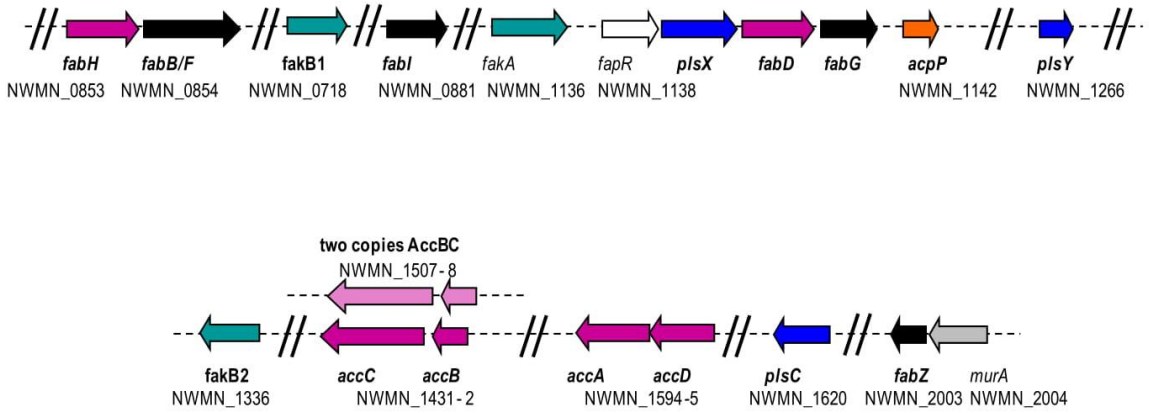
Supplementary Fig. 1. FASII pathway in *S. aureus* and anti-FASII drug targets

FASII comprises an initiation step (enzymes in magenta), in which Acc carboxylase (AccBCDA) uses acetyl-CoA to produce malonyl-CoA, FabD transacylase transfers the malonyl group from CoA to ACP (acyl carrier protein), and FabH (β-ketoacyl-ACP synthase III) joins either acetyl-CoA and malonyl-ACP to form acetoacetyl-ACP, or alternatively uses branched chain (BC) acyl-CoA (formed from branched chain amino acids*)* instead of acetyl-CoA to condense with malonyl-ACP: this leads to branched chain FA formation. The acyl-ACP substrates then enter a cycle of recursive FA synthesis. FapR is a repressor of both FASII and phospholipid synthesis genes (*fabD*, *fabH*, *fabG*, *fabI*, *fabF*, *plsX*, and *plsC* targets are in bold) [1]. FapR repression is alleviated by malonyl-CoA and malonyl-ACP [1-3].

The FA elongation cycle (enzymes in black) comprises four consecutively acting enzymes; Int1-ACP to Int3-ACP represent reaction intermediates. FabG, the β-ketoacyl-ACP reductase, uses either FabH initiation products, or already elongated FA intermediates (FabF products) as substrates. FabZ dehydrates the FA intermediate, and FabI enoyl reductase completes the cycle to form acyl-ACP, which either continues in the cycle to add a new 2-carbon malonyl group (from malonyl-ACP) *via* FabF, or is used for phospholipid synthesis by Pls enzymes (blue). The described steps are characterized in previous work [4,5]. FASII may accept non-conventional substrates, i.e., for biotin or lipoic acid synthesis (grey) [6,7]. FabI inhibitors triclosan, AFN-1252, and FabF inhibitor platensimycin are used in this work.

Fak genes (turquoise) are essential for phosphorylation of exogenous fatty acids, the first step in their incorporation in phospholipids [8]. PlsY can then join the phosphorylated fatty acid to position 1 of the glycerol-phosphate backbone. An alternative possibility is that the phosphorylated fatty acid is used by PlsX in a reverse reaction that converts it to long-chain acyl-ACP, which would then be joined to position 2 of the glycerol-phosphate backbone by PlsC [8]. The present work provides evidence for the latter reaction in *S. aureus* (see Fig. 7).

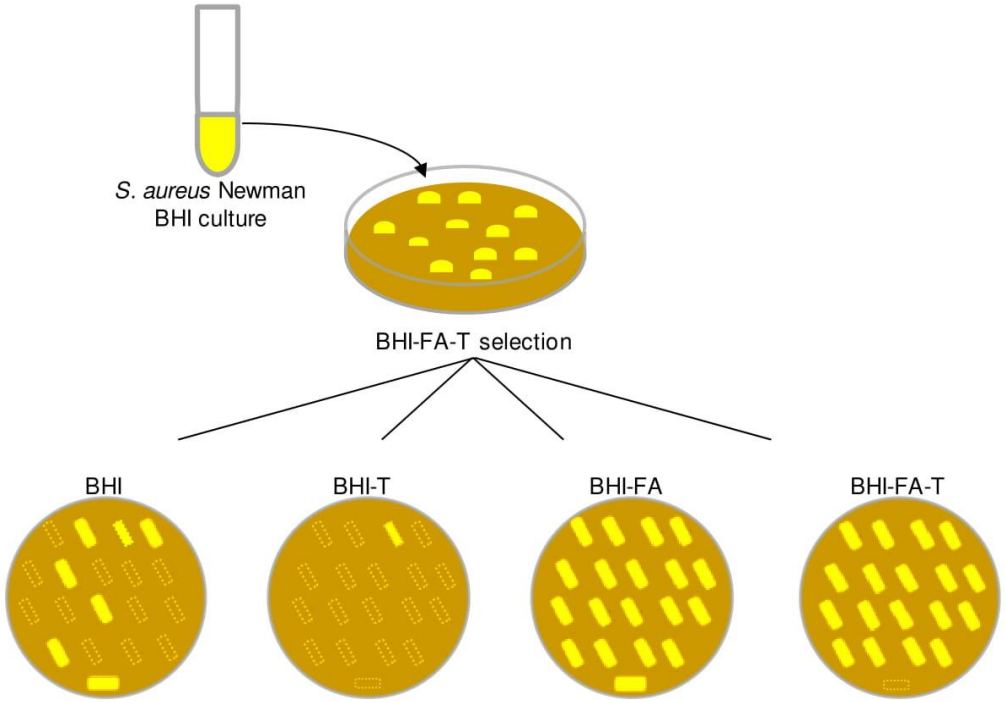
Supplementary Fig. 1



Supplementary Fig. 2. Organization of known FASII and associated genes in *S. aureus* Newman

Known FASII and associated genes leading to phospholipid synthesis are depicted. Magenta, genes involved in FASII initiation; Black, the recursive elongation cycle; Blue, termination and synthesis of phosphatidic acid (see [5] for review); turquoise, *fak* genes identified as needed for exogenous FA incorporation; *fakA*, *fakB1* (C14 and C16 –specific) and *fakB2* (C18:1 –specific) phosphorylate exogenous FA in *S. aureus*, mediating their utilization for phospholipid synthesis [8]. White, FapR regulator of FASII and phospholipid synthesis genes [1]; grey, non-FASII gene in an operon with *fabZ.* Two copies of AccBC appear to be present on the Newman genome; the role of NWMN_1507/NWMN_1508 is unknown. Orange, *acpP*, encodes ACP which is required in major steps throughout FASII and phospholipid synthesis.

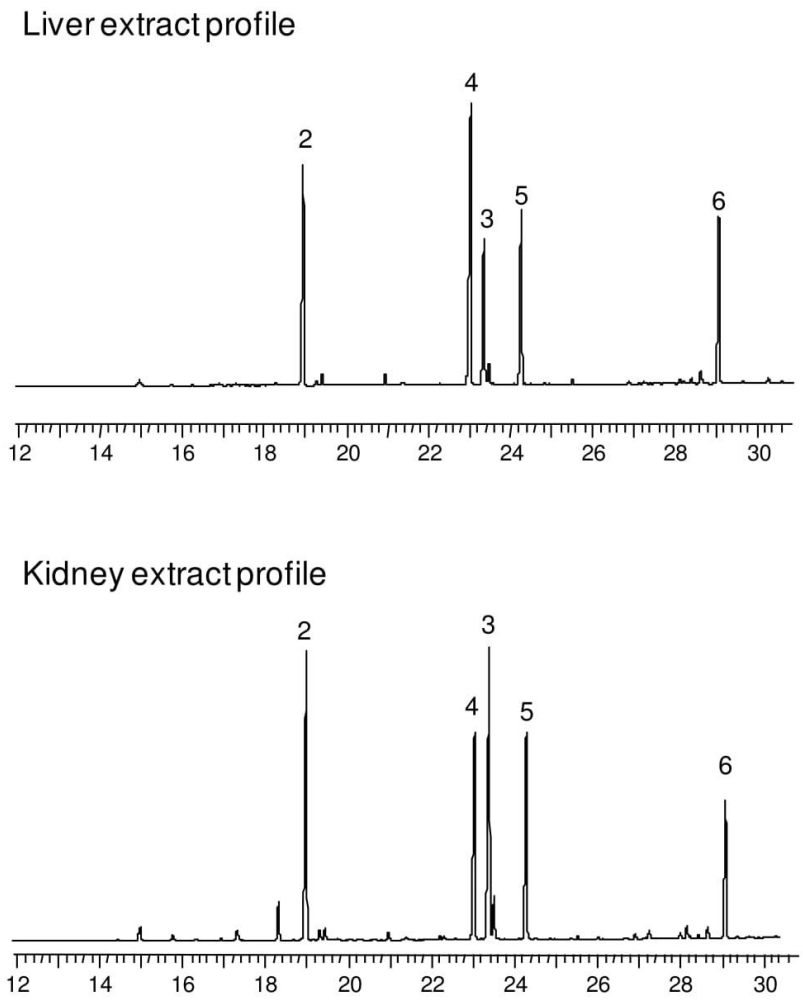
Supplementary Fig. 2



	BHI	BHI-FA	BHI-T	BHI-FA-T
Triclosan-resistant	+	+	+	+
FA-dependent for growth and triclosan-resistance ($DepT^R$)	-	+	-	+
Normal growth, uses FA for triclosan-resistance ($CondT^R$)	+	+	-	+

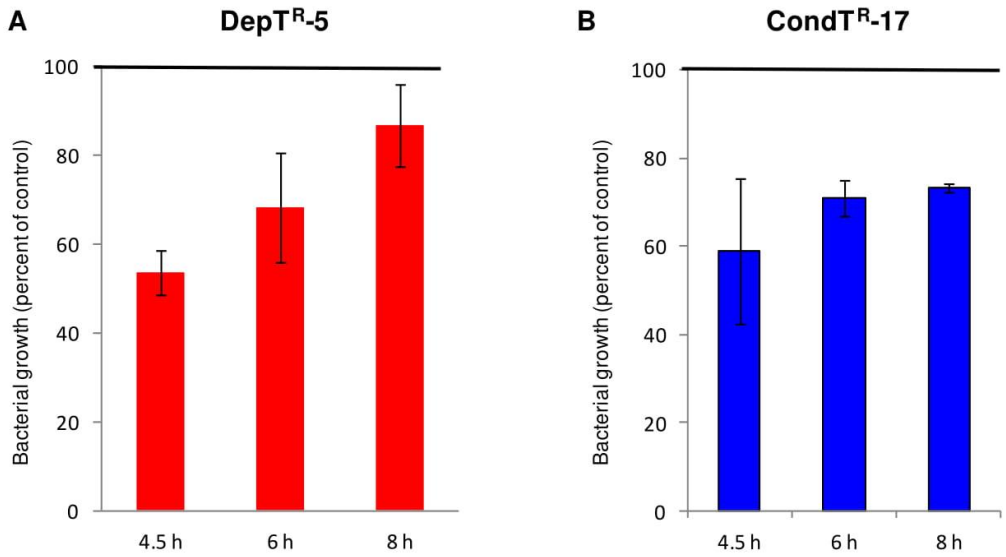
Supplementary Fig. 3. Experimental design for identification of FASII bypass mutants
Dilutions of overnight BHI cultures of *S. aureus* Newman strain are plated on BHI-FA-T medium and incubated at 37°C for 48 hours. FA-T^R-resistant colonies are repicked to BHI, BHI-FA, BHI-T, and BHI-FA-T medium, containing as appropriate fatty acids C14:0, C16:0 and C18:1 (0.17 mM each), and triclosan (0.25 µg/mL). The horizontal streak at the bottom of plates corresponds to the parental Newman strain. Plate interpretation is indicated in Table below. Phenotypes of candidate mutants are confirmed after clone purifications. Note that proportions of FA-dependent and conditional mutants varied between experiments and duration of incubation of selection plates. In the absence of fatty acids, $DepT^R$ clones grow poorly or not at all , whereas $CondT^R$ clones grow normally.

Supplementary Fig. 3



Supplementary Fig. 4. Fatty acid profiles of liver and kidney extracts used as fatty acid supplements
Organ preparation and extracts for gas chromatography are described in Methods. Fatty acids are: 2- C16:0; 3- C18:1; 4- C18:0; 5- C18:2; 6- C20:4.

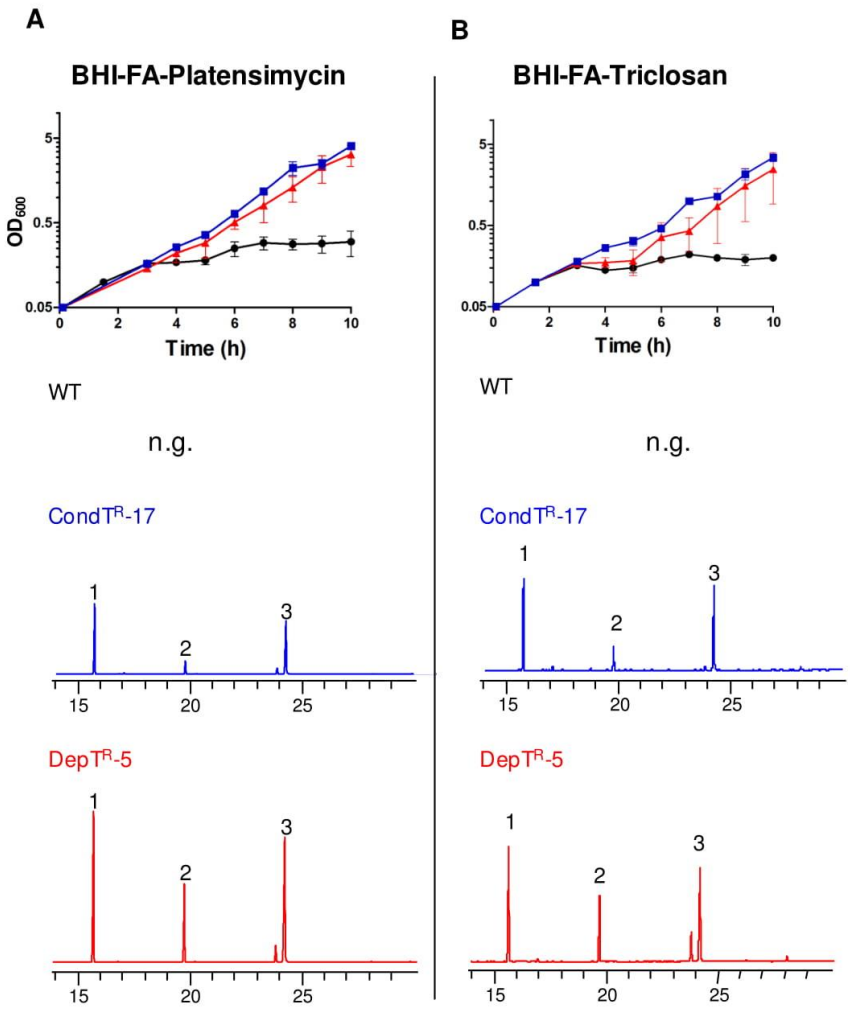
Supplementary Fig. 4



Supplementary Fig. 5. Complementation of DepT^R-5 and CondT^R-17 *fabD* mutants by wild type *fabD* leads to a growth lag in triclosan

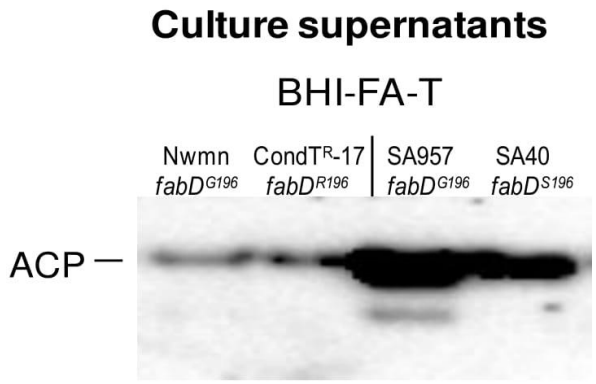
Experimental conditions are as in Fig. 4. Histograms above represent the relative growth at different time points, of FA-T^R (pJ-fabD) mutants compared to the respective control strain FA-T^R (pJ), grown in LB-triclosan with kidney extract. Ratios are determined at the indicated growth times for each of three independent experiments. **A**, Ratio of OD_{600} DepT^R-5 (pJ-FabD) to Dep-5 (pJ); **B,** Ratio of OD_{600} CondT^R-17 (pJ-FabD) relative to Cond-17 (pJ). Growth of reference strains DepT^R-5 (pJ) and CondT^R-17 (pJ), is set at 100% (black line). The presence of pJ-FabD-carrying strains systematically showed a growth lag when triclosan was present, compared to the cognate strains carrying the control plasmid.

Supplementary Fig. 5



Supplementary Fig. 6. *S. aureus* FA-T^R strains DepT^R-5 and CondT^R-17 bypass inhibitors of FabI and also FabF
Newman WT, CondT^R-17, and DepT^R-5 strains were grown in BHI-FA containing **A**, platensimycin 2 µg/mL, or **B**, triclosan (0.25 µg/ml) for comparison. Results of WT and CondT^R-17 with triclosan in **B** are shown in Fig. 2 as experiments were performed at the same time. Growth curves (upper) show the average of two biologically independent duplicates. The range of OD_{600} for each time point is presented. Corresponding fatty acid profiles from the 10 H point (lower) of one experiment are shown. N.g., no growth. Endogenous branched-chain fatty acid (*ai*15:0) is indicated with arrows. Fatty acids are 1- C14:0; 2- C16:0; and 3- C18:1, the fatty acids comprised in BHI-FA-T medium. Black, WT; blue, CondT^R-17; red, DepT^R-5.

Supplementary Fig. 6



Supplementary Fig. 7. ACP release into supernatant is unaffected by *fabD*^{196} polymorphisms
Experiments were performed as described in Fig. 7 and in Methods. In the same experiments, supernatants were recovered, filter-sterilized, and concentrated ten-fold using Amicon Ultra-2ml membranes (3 Kd cutoff; Merck**,** France). Samples were treated with DTT (200 mM) to dissociate ACP from acyl groups. Amounts loaded on conformation-sensitive gels correspond to 0.25units of OD_{600} as for cell pellets (see **Fig. 7**). Anti-ACP antibodies were used to identify ACP moieties after gel transfer. The portion of the gel giving a signal with anti-ACP antibodies is shown. Nwmn is the parental strain for CondT^R-17; SA957 and SA40 are closely related clinical isolates belonging to ST59 [9]. For both pairs, the encoded FabD enzymes differ from their respective reference strains by a single change at amino acid position 196. The migration position of free ACP is indicated.

Supplementary Fig. 7

Supplementary References

1. Albanesi D, Reh G, Guerin ME, Schaeffer F, Debarbouille M, et al. Structural basis for feed-forward transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Staphylococcus aureus*. PLoS Pathog 9: e1003108 (2013).
2. Schujman, G.E., Paoletti, L., Grossman, A.D. & de Mendoza, D. FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Dev Cell* **4**, 663-72 (2003).
3. Martinez, M.A. *et al.* A novel role of malonyl-ACP in lipid homeostasis. *Biochemistry* **49**, 3161-7 (2010).
4. Schiebel J, Chang A, Lu H, Baxter MV, Tonge PJ, et al. *Staphylococcus aureus* FabI: inhibition, substrate recognition, and potential implications for in vivo essentiality. Structure 20: 802-813 (2012).
5. Zhang YM, Rock CO. Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nat Rev Microbiol 6: 222-233 (2008).
6. Agarwal V, Lin S, Lukk T, Nair SK, Cronan JE. Structure of the enzyme-acyl carrier protein (ACP) substrate gatekeeper complex required for biotin synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 17406-17411 (2012).
7. Cronan JE. Biotin and Lipoic Acid: Synthesis, Attachment and Regulation. Ecosal Plus 2014. (2014)
8. Parsons JB, Broussard TC, Bose JL, Rosch JW, Jackson P, et al. Identification of a two-component fatty acid kinase responsible for host fatty acid incorporation by *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 10532-10537 (2014).
9. Chen, C.J. *et al.* Characterization and comparison of 2 distinct epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage. *PLoS One* **8**, e63210 (2013).

2) Sans mutation de la voie FASII

Article n°2 « Host factors promote Staphylococcus aureus fatty acid outsourcing and FASII antibiotic adaptation » (soumis le 15-06-2018)

Dans cet article nous avons pu montrer que *S. aureus* a la capacité de contourner les anti-FASII en incorporant les acides gras exogènes sans mutation de la voie FASII. Cette adaptation est possible lorsqu'il y a une baisse de la toxicité des acides gras par la présence de sérum. Cet article met en avant le fait que les acides gras exogènes peuvent se retrouver dans les deux positions des phospholipides, ce qui a été jusqu'à présent énoncé comme impossible. Ces résultats sont d'autant plus étonnants que la prise des acides gras exogènes dans ces deux positions est possible, même en dehors de l'utilisation des anti-FASII. Cette adaptation semble toucher environ 3% des cellules, et nous avons pu observer un grand nombre de cellules semblant avoir un problème de division cellulaire durant cette adaptation nous menant à nous poser la question sur le processus de division cellulaire dans le contournement aux anti-FASII.

Host factors promote *Staphylococcus aureus* fatty acid outsourcing and FASII antibiotic adaptation

Gérald Kénanian[1a], Claire Morvan[1ab], Karine Gloux[1], Laetitia Dupont[1], David Halpern[1], Audrey Solgadi[2], Julien Deschamps[3], Jamila Anba-Mondolini[1], Amit Pathania[1], Céline Henry[3], Gilles Lamberet[1], and Alexandra Gruss[1]*

[1] MicrobAdapt lab, Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy en Josas, France, [2] SAMM, UMS IPSIT, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Chatenay-Malabry, France [3] Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

[a] Authors contributed equally to this work

[b] Current address: Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Universite Paris-Sud, Universite Paris-Saclay, Orsay 91400, France

* Corresponding author

Summary

Essentiality of fatty acid synthesis (FASII) products in the major human pathogen *Staphylococcus aureus* is the rationale for intensive development of antimicrobials targeting FASII, with proven activities *in vitro*. We report that lowering fatty acid stress, here by serum, subverts anti-FASII inhibitors by stimulating environmental fatty acid (eFA) replacement in *S. aureus* membrane phospholipids. Antibiotic escape follows a transient latency period and emergence of 2-3% of the population whose phospholipids comprise exclusively eFAs. Fatty-acid-induced permeability and stress are known to decrease acyl carrier protein pools and activate eFA efflux, which explain inefficient eFA incorporation. Reversal of fatty-acid-stress-related phenotypes by serum correlates with occupation of both membrane phospholipid positions by non-staphylococcal eFAs even in the absence of antibiotic. These findings overturn the hypothesis driving anti-FASII development by showing that *S. aureus* FASII is not essential and establish a paradigm for non-mutational antibiotic escape by compensatory metabolite outsourcing in low stress.

- ***S. aureus* FASII essentiality, a rationale for antibiotic development, is disproven**
- **Exogenous fatty acids (eFAs) occupy both phospholipid positions in low fatty acid stress**
- **Host factors reduce stress due to eFAs, promoting their integration and anti-FASII adaptation**
- **A novel antibiotic adaptation mechanism is based on metabolite outsourcing dictated by host factors**

Keywords: Adaptation mechanisms, cell division, membrane phospholipids, fatty acid stress, fatty acid efflux, Acyl Carrier Protein

Introduction

Antibiotic resistance acquisition is the major cause of ineffective treatment of serious bacterial infections. Resistance acquisition often correlates with permanent genetic changes mediated by horizontal gene transfer, spontaneous mutations or DNA rearrangements. Adaptation to antibiotics also occurs by transient non-mutational alterations that may induce bistable changes in gene expression conferring survival to a bacterial subpopulation (Brauner et al., 2016; Davies and Davies, 2010; Dubnau and Losick, 2006). Antibiotic efficacy may vary according to the bacterial energetic status, which changes according to metabolic activity and/or the stress state. Transition to a "persister" state allows survival of a bacterial subpopulation that undergoes slow or no growth during the period of antibiotic exposure (Shah et al., 2006).

A striking distinct example of antibiotic escape is environment-dependent and concerns a class of antibiotics that target the fatty acid synthesis pathway (FASII) (Balemans et al., 2010; Escaich et al., 2011; Karlowsky et al., 2009; Park et al., 2007; Tsuji et al., 2013; Wang et al., 2007; Wang et al., 2006; Yum et al., 2007). Antimicrobials such as triclosan and cerulenin lose potency against numerous bacteria when growth media contain environmental fatty acids (eFAs) (Brinster et al., 2009, 2010). The eFAs provide an alternative fatty acid source, which were shown to be directly incorporated in bacterial lipids to overcome the FASII block (called "FASII bypass"). The consequences of eFA incorporation are particularly relevant to infection conditions, as the animal host is rich in fatty-acid-containing lipids; bacteria can thus remodel their membranes using available fatty acids and escape FASII inhibition. FASII bypass was extensively studied in *Streptococcus agalactiae*, a major neonatal pathogen, and occurs in other bacteria (Brinster et al., 2009, 2010; Giles et al., 2011; Saito et al., 2014; Sato et al., 1991).

Staphylococcus aureus is a major human pathogen for which treatment failure and emergence of methicillin resistant strains (MRSA) are driving efforts for drug development (Lowy, 2013). While FASII efficacy was ruled out for various Firmicute pathogens, *S. aureus* was considered the exception. An *S. aureus* requirement for endogenously synthesized branched chain fatty acids, specifically anteiso 15 (*ai*15), served as rationale for sustained development of FASII-targeted antimicrobials (Parsons et al., 2011; Schiebel et al., 2012; Schiebel et al., 2014) (Albanesi et al., 2013; Escaich et al., 2011; Hunt et al., 2016; Kaplan et al., 2013a; Parsons et al., 2011; Schiebel et al., 2014; Yum et al., 2007).

Our recent studies revealed that *S. aureus* anti-FASII resistance arose by high frequency mutations that facilitated the use of eFAs; those studies showed that single missense mutations in *fabD* mutants could dispense with the *ai*15 requirement (Morvan et al., 2016). Natural clinical and

community isolates bearing similar *fabD* polymorphisms also bypassed FASII inhibitors (Gloux et al., 2017; Morvan et al., 2016; Morvan et al., 2017).

Here we report on a novel adaptive mechanism by which wild type *S. aureus* procures eFAs to escape FASII antibiotics. Low fatty acid stress is promoted by host factors, and facilitates *S. aureus* capture of eFAs and consequent FASII antibiotic escape. Results of this study overturn the reigning hypothesis of *S. aureus* position-related phospholipid stringency that drives FASII inhibitor development. They establish an alternative paradigm for bacterial antibiotic adaptation.

Results

S. aureus adapts to FASII inhibition in serum or organ extracts after transient latency

Septicemia exposes bacteria to fatty-acid-rich host fluids and organs. We investigated potential effects of such complex host environments on *S. aureus* sensitivity to FASII inhibitors. For this, sensitivity to the FASII inhibitor triclosan (Tric, used at ~100X MIC) was challenged in media containing a 3-fatty-acid cocktail (FA-Tric; (Morvan et al., 2016)) or the same media supplemented with serum (SerFA-Tric). MRSA *S. aureus* USA300 FPR3757 (USA300) and antibiotic sensitive Newman strains were tested. Without serum, mutants emerged after 24-48 h incubation (Morvan et al., 2016). Serum supplementation led to a significantly shorter latency period (USA300, ~8 h; Newman, ~10 h), and was followed by normal growth (**Fig. 1A**, **Fig. S1A**).

Pharmacological studies reported that serum binds and may thus neutralize FASII inhibitors (Balemans et al., 2010; Hunt et al., 2016). If this were the case, *S. aureus* FASII would be active and *S. aureus* fatty acids would be endogenous. However, fatty acid profiles during outgrowth in SerFA-Tric medium were totally exogenous (**Fig 1B**, and **suppl Fig. S1**). Addition of liver or kidney extracts (without added fatty acids) to USA300 cultures gave similar latency and outgrowth kinetics in the presence of anti-FASII, and resultant cultures displayed exogenous fatty acid profiles that coincided with organ profiles (**Fig. S2**). These results show that triclosan is active in the presence of host constituents but ineffective in blocking *S. aureus* growth.

Serum reduces fatty-acid-induced stress

Fatty acid toxicity is attributed to bacterial membrane disruption; however, serum components such as albumin bind fatty acids and may counteract their toxic effects (Greenway and Dyke, 1979; Lacey and Lord, 1981; Litus et al., 2017; Nemashkalova et al., 2017; Nicolaides, 1974; Parsons et al., 2012). Here, the slight growth lag of USA300 in fatty acid medium was alleviated by serum (**Fig. 1A**)**.** Cell

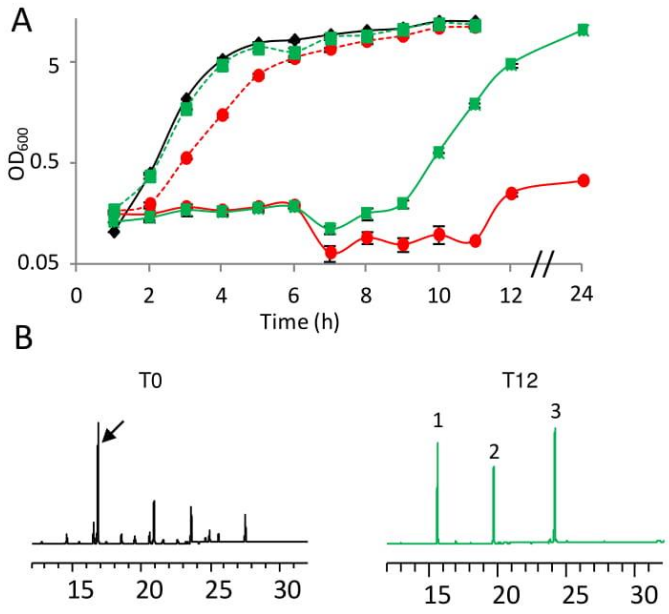


Fig. 1. *S. aureus* bypass of a FASII-targeted antibiotic is accelerated in serum.

S. aureus USA300 strain was cultured in BHI, and FA or SerFA medium containing or not Triclosan (FA-Tric and SFA-Tric, respectively). **A**. Bacterial optical density (OD_{600}). In SerFA-Tric, growth resumed after an ~8 h latency period, whereas no growth was observed over 24 h in FA-Tric. Black line, BHI; red lines FA (dashed), and FA-Tric (solid); green lines, SerFA (dashed), and SerFA-Tric (solid). Curves are the average of three biological replicates. **B**. Fatty acid profiles. USA300 in BHI is shown at left, and that of a representative SerFA-Tric culture at OD_{600} =1 is at right. SerFA-Tric–grown cells replace endogenous fatty acids, as produced in BHI cultures (T0), by the 3 eFAs (harvested at 12 h; T12). Black arrow indicates endogenously produced ai15. eFAs: 1, C14; 2, C16, 3, C18:1. Representative fatty acid profiles are shown.

vitality was compared upon growth in BHI, FA, or SerFA medium to OD_{600} = 1, or in FA-Tric and SerFA-Tric after six hours of growth, using Syto9-PI vitality-permeability stains (**Fig. 2A, 2B**). Direct eFA addition to BHI USA300 cultures led to cell permeability in a majority of the population, both without or with Tric addition. Serum addition relieved eFA-linked permeability in both cases.

A notable feature of cultures containing triclosan was the large proportion of tetrads; 28% tetrads were counted in SerFA-Tric cultures, compared to essentially none detected in non-selective medium. Many tetrads showed mixed red-and-green staining (**Fig. 2B, 2C**). Tetrads were also observed in FA-Tric but could not be counted due to extensive bacterial clumping. The above observations suggest that cell separation may be a bottleneck during the latency phase.

Direct plating of USA300 FA-Tric and SerFA-Tric 6 h cultures (during latency) on solid non-selective media were compared (**Fig. 2D**). Bacterial counts after 6 h in SerFA-Tric were slightly higher than those prior to triclosan addition (T0). In comparison, counts of 6 h FA-Tric cultures were about 100-fold lower than those at T0, indicating that plating efficiency of FA-Tric cells in the permeabilized state was poor. The latter colonies were pinpoint-sized, compared to large colonies in SerFA-Tric, further indicative of the protective effects of serum. These observations show that serum contributes to improving bacterial fitness due to eFA toxicity, regardless of anti-FASII.

Preadaptation in serum-containing medium accelerates FASII bypass

With few exceptions, antibiotic treatments are administered post-infection, *i.e.*, after bacteria are disseminated and exposed to host lipids. We mimicked this situation by preparing USA300 precultures in SerFA, after which triclosan or AFN-1252, an antistaphylococcal pipeline drug (Kaplan et al., 2013b), was added to cultures diluted in the same medium. SerFA-Tric and SerFA-AFN cultures initiated outgrowth respectively 2 and 3 hours earlier when bacteria were preadapted in SerFA (**Fig. S3**). All cultures, regardless of preadaptation, displayed exogenous fatty acid profiles after 12 h growth, confirming eFA replacement. The capacity to bypass FASII-targeted antibiotics is thus accelerated by pre-existing exposure to eFA-containing medium.

***S. aureus* anti-FASII adapted subpopulations exit latency**

S. aureus viability during anti-FASII-induced latency (**Fig. 2**) led us to to estimate the proportion and timing of cell outgrowth from anti-FASII inhibition *via* eFA utilization. To this purpose, we examined *S. aureus* USA300 microcolony development in static biofilm conditions by time lapse microscopy using cells pre-incubated in SerFA to more closely simulate host infection. Growth kinetics was followed for wild type USA300 expressing GFP (pCM11) in SerFA-AFN (**Movie 1** and **2**) and SerFA-Tric (**Movies 3** and **4)**. BHI, FA, and SerFA cultures used as control showed rapid confluent growth (respectively **Movies 5**–**7**). In SerFA-AFN, microcolonies arose in waves beginning at around 18-19 h

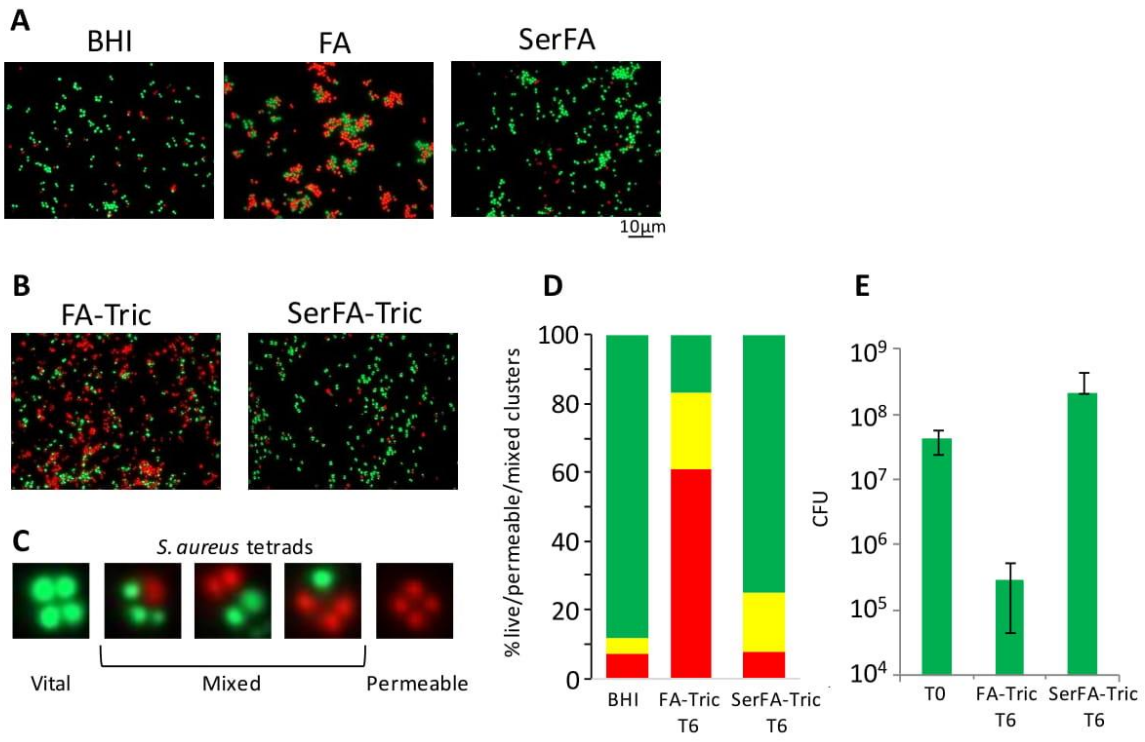


Fig. 2. Serum improves *S. aureus* vitality during fatty acid and anti-FASII treatment.

S. aureus USA300 was cultured in **A,** BHI, FA, or SerFA media to OD_{600}=0.5-1, and **B,** in FA-Tric or SerFA-Tric for 6 h. Cells were stained with Syto9™ (for cell vitality; green) and Propidium iodide (PI, for cell permeability; red), and visualized by fluorescence microscopy. **C.** Tetrad clusters were frequent in SerFA-Tric selections (~28% of total cells; cell clumping in FA-Tric prevented accurate counting), and often comprised differently stained cells as illustrated in zooms ("Mixed"). **D.** Proportions of Syto9™-stained and PI-stained cells were counted in BHI, FA-Tric, and SerFA-Tric samples. Tetrads containing mixed-stained cells were counted and considered separately (yellow). At least 10,000 cells were used per condition, and data from 3 independent experiments giving comparable images were pooled. **E.** CFUs were determined in parallel on the independent cultures used for microscopy (BHI prior to transfer to selective medium [T0], and FA-Tric and SerFA-Tric samples 6 h post-treatment [T6]) by performing dilutions on non-selective medium. These results show that FA- and FA-Tric-induced mortality is alleviated by serum.

after the start of treatment (**Fig. 3** and **Movie 1**; **Fig. S4** and **Movie 3**). Single colonies appeared earlier in some wells, and dominated the microscopy field (**Movies 2** and **4**). Altogether, 3.1% of the bacterial population emerged as rapidly growing microcolonies in SerFA-AFN, and 2.8% emerged in SerFA-Tric (from respectively 6 and 10 visual fields). In the presence of selection, fatty acid profiles of bacteria harvested after growth were exogenous, confirming the action of anti-FASII. Thus in the tested conditions, *S. aureus* cell outgrowth from anti-FASII-induced latency occurs in a subpopulation of adapted bacteria.

In the following sections, we investigate mechanistic features of eFA replacement leading to FASII antibiotic bypass.

Serum-associated adaptation to anti-FASII occurs in the absence of FASII pathway gene mutations

Genome sequencing was performed on 3 USA300 and 3 Newman independent colonies after exit from SerFA-Tric latency phase, and 3 USA300 colonies after exit from SerFA-AFN. USA300 and Newman cultures grown without selection were used as references (**Table S1**). FASII bypass was confirmed in the adapted cultures as having fully exogenous fatty acid profiles. Significantly, with the exception of one strain, no FASII-related mutations were detected in triclosan- or AFN-1252-adapted cultures. The exception, USA300 SerFA-AFN B, contained a single nucleotide polymorphism (SNP) creating a stop codon in *accB* (SAUSA300_1476); *acc* mutations were shown to facilitate FASII bypass in the absence of serum (Morvan et al., 2016; Parsons et al., 2011). One strain showed no detectable genome mutations (USA300 SerFA-Tric 1). Other SNPs were detected in individual clones, but none were common to all sequenced strains**.** Four of five identified SNPs in USA300 *orfs* and the SNP in Newman strain correspond to common variants (Kennedy et al., 2008; Sause et al., 2017; SenGupta et al., 2014), and we could not rule out their emergence in the pre-culture. USA300 transposon library mutants affected in the five *orfs* containing SNPs and the parental strain were compared for growth in SerFA-Tric medium (SAUSA300_0226, SAUSA300_0242, SAUSA300_0407, SAUSA300_1177, and SAUSA300_1684; (Fey et al., 2013)). Timing of outgrowth of parental and mutant strains was equivalent (data not shown), indicating that inactivation of these loci did not impact FASII bypass. Based on these verifications, we excluded a role for these loci in FASII bypass.

eFA delivery in serum reduces loss of acyl carrier protein (ACP) and diminishes expression of fatty acid efflux pump FarE

ACP is required for all steps of FASII and acyl-ACPs are intermediates of eFA incorporation in phospholipids (Majerus et al., 1964; Morvan et al., 2016). eFAs induce membrane leakage leading to decreased *S. aureus* ACP pools, which could limit eFA utilization during FASII inhibition (Parsons et al., 2011; Parsons et al., 2012). ACP pools were compared by immunoblotting using anti-ACP antibodies

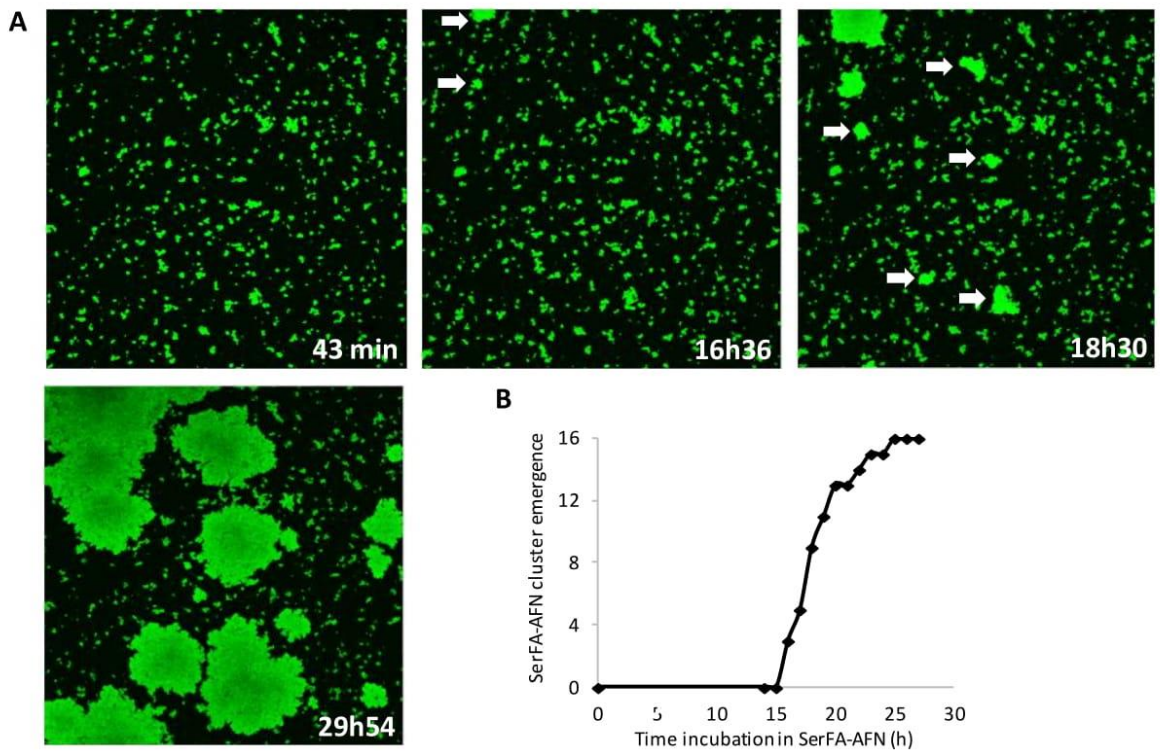


Fig. 3. Kinetics of *S. aureus* adaptation to FASII antibiotic AFN-1252 in biofilm conditions.

Growth of *S. aureus* USA300 expressing GFP in SerFA-AFN was monitored by fluorescence microscopy over 60 h; events of the first 30 h are shown. **A.** Still frames from the video (Supplemental data **Movie 1**), were selected at the indicated times to illustrate progression of emerging adapted cells. AFN-1252-adapted microcolonies began to appear at around 16 h (white arrows), followed by waves of emerging adapted cell clusters. **B.** The cumulative number of developing AFN-1252-resistant cell clusters is presented as a function of growth time. In this video, 580 clusters were counted at the start of the experiment. Fatty acid profiles of cells recovered at the end of experiments were exogenous, showing that eFA replacement occurred during growth.

in total extracts from SAUSA300_0113 *spa* cultures grown without and with serum and triclosan (**Fig. 4A**). ACP levels were lower in FA medium as compared to BHI medium, as reported (Parsons et al., 2012). ACP was barely detected after 2 h in FA-Tric medium (**Fig. 4A**). In contrast, serum addition led to increased ACP detection at both 2 h and 4 h post-triclosan treatment. Serum thus seems to counteract ACP depletion due to fatty acids and triclosan.

Expression of the recently characterized *S. aureus* fatty acid efflux pump FarE is induced by unsaturated fatty acids, and results in lower cellular eFA accumulation (Alnaseri et al., 2015). A proteomics approach performed under the same conditions as used above for ACP Western blots confirmed that FarE expression in the USA300 *spa* strain was highly induced by eFAs, compared to no detected protein in BHI cultures, as described (Alnaseri et al., 2015). FarE was also highly induced in FA-Tric. In marked contrast, FarE protein was essentially absent in cells issued from serum-containing cultures despite the presence of eFAs (**Fig. 4B**).

The above results give evidence that intracellular pools of the substrates needed for eFA incorporation, ACP and eFAs, may be higher in serum. Higher substrate concentrations could favor eFA replacement of endogenously synthesized fatty acids, and allow escape from FASII antibiotics.

***S. aureus* eFA incorporation efficiency is enhanced by serum**

We reasoned that higher intracellular ACP and eFA pools could accelerate eFA incorporation. To test this, *S. aureus* lipid content was compared in the presence and absence of serum. USA300 fatty acid profiles were determined 6 h after a shift from BHI to FA and SerFA media without and with triclosan; BHI cultures were used as reference (**Fig. 5A-C**). After 6 h growth without inhibitor (**Fig. 5A** and **5B,** upper panels), the proportion of eFA among total fatty acids was ~35% in FA medium compared to ~46% in SerFA (**Fig. 5D**). Appearance of C20:1, an elongation product of eFA C18:1, gives proof of FASII activity. More pronounced effects of serum on eFA incorporation were observed with triclosan. The proportion of eFAs among total fatty acids at 6 h was 16% in FA-Tric, and 48% in SerFA-Tric; in these conditions, triclosan inhibition is evidenced by the quasi-absence of C18:1 elongation (**Fig. 5A** and **5B** lower panels; **Fig. 5D**). Thus, serum facilitates eFA utilization both in the absence and presence of FASII inhibitors. This observation is consistent with lower eFA toxicity and greater ACP and eFA intracellular availability associated with serum (**Fig. 4**).

eFAs occupy both phosphatidylglycerol (PG) positions of the *S. aureus* phospholipid backbone in non-selective and anti-FASII-selective growth

The rationale for developing FASII inhibitors against *S. aureus* is based on the reported invariance of the endogenous branched chain fatty acid *ai*15 in the phospholipid 2-position (Albanesi et al., 2013; Balemans et al., 2010; Parsons et al., 2011; Schiebel et al., 2012; Schiebel et al., 2014). However, the

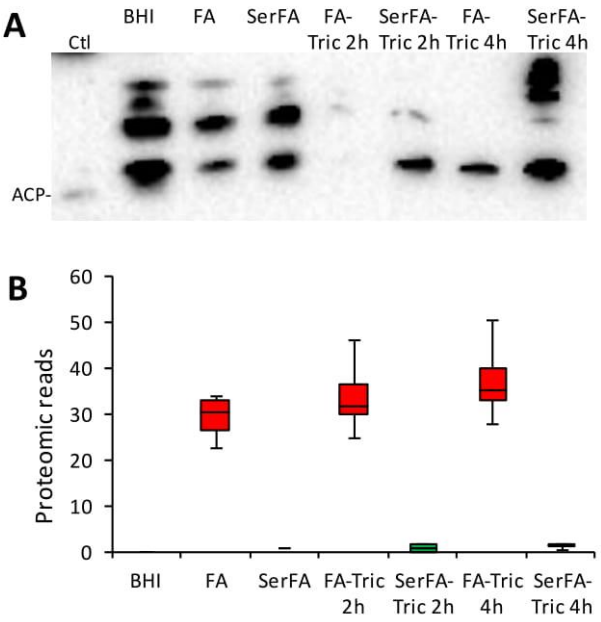


Fig. 4. Serum affects *S. aureus* homeostasis of ACP and eFA pools.

A. ACP immunodetection. Cell extracts were prepared from *S. aureus* USA300 *spa* strain (SAUSA300_0113) grown in: 1, BHI (OD_{600} = 1); 2, FA (OD_{600} = 1); 3, SerFA (OD_{600} = 1); 4, FA-Tric for 2 h; 5, SerFA-Tric for 2 h; 6, FA-Tric for 4 h; 7, SerFA-Tric for 4 h. Purified ACP was used as a reference for free ACP migration. Equivalent protein concentrations were loaded on SDS-PAGE gels. Immunoblotting was performed using anti-ACP antibody (Morvan et al., 2016). Multiple bands were previously observed with anti-ACP antibody (*e.g.*, (Babu et al., 2010) and may correspond to non-dissociable acyl-ACP-protein complexes. **B.** Fatty acid efflux pump FarE expression. Proteomic analyses were performed on *S. aureus* USA300 in the same conditions as in **A.** Greater FarE expression in the presence of free eFAs was observed as reported (Alnaseri et al., 2015). In contrast, little or no FarE was detected in serum-containing conditions. Quadruplicate independent samples were used for immunoblots and proteomic analyses.

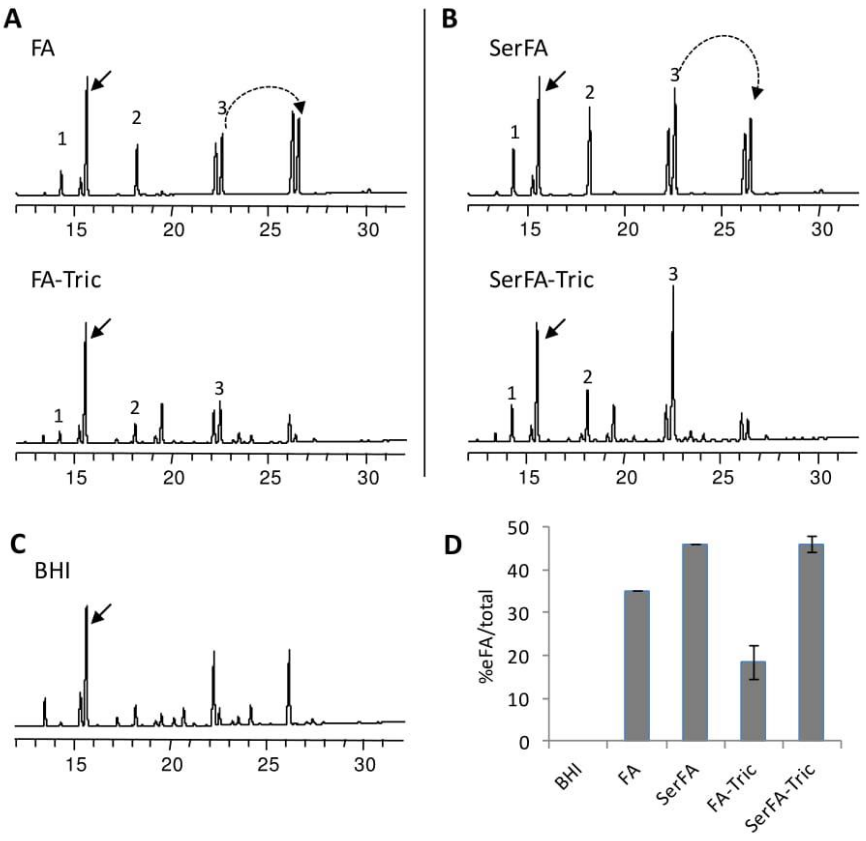


Fig. 5. *S. aureus* eFA utilization during latency is more efficient in the presence of serum.

S. aureus USA300 cultures were harvested 6 h after growth in the 3-fatty-acid cocktail medium, **A** without, or **B** with serum. Lower panels of **A** and **B** show equivalent cultures treated with anti-FASII triclosan. **C.** Untreated USA300 culture in BHI medium was used as reference. Fatty acid profiles were determined by gas chromatography. Dashed curved arrows indicate eFA C18:1 elongation to C20:1. **D.** The proportions of eFAs among total fatty acids were determined from profiles of 4 biological replicates for each condition. Black arrow indicates endogenously produced *ai*15. eFAs: 1, C14; 2, C16, 3, C18:1. Note that continued growth to 10 h leads to fully exogenous fatty acid profiles in SerFA-Tric.

above results showing full eFA replacement of endogenous synthesis disprove the generality of *S. aureus* phospholipid stringency (**Fig 1B, Fig. S1**).

eFA incorporation in both *S. aureus* phospholipid positions might be a "last resort" choice due to the absence of the preferred substrate *ai*15. Alternatively, the use of eFA *versus ai*15 may simply depend on intracellular substrate availability. To distinguish between these possibilities, we investigated eFA substitution at both phospholipid positions in non-selective conditions, or with antibiotic treatment. To remove ambiguity in distinguishing endogenous from exogenous fatty acids in phospholipid identifications, a cocktail of unsaturated eFAs 17:1*trans* and 18:1*cis* prepared in delipidated serum (medium referred to as dSer2FA) was used to supplement *S. aureus* USA300 growth. The more rigid 17:1*trans* species was added to provide phospholipid balance for membrane fluidity. Although structurally distinct from *S. aureus* endogenous fatty acids, 17:1*trans* and 18:1*cis* did not interfere with growth in serum-containing medium (OD_{600} = 6.4 for both BHI and dSer2FA cultures at 6 h). Cells were pre-cultured in the same medium without antibiotic prior to anti-FASII addition as would be the case in infections. Fatty acid profiles and PG contents were first determined in cultures without anti-FASII, and then at 4, 6, 8, 10, and 15 h after treatment with anti-FASII drugs AFN-1252 and triclosan.

In non-selective growth, fatty acid profiles first revealed that 17:1*tr* and 18:1*cis* comprised nearly 60% of the total fatty acid content (**Fig. 6, Fig. S5**). Endogenous straight chain saturated fatty acids showed a concomitant decrease compared to BHI cultures. Significantly, 20-25% of PGs comprise only eFAs after 6 h without antibiotic. 18:1*cis*|18:1*cis*, 17:1*tr*|20:1*cis*, 18:1*cis*|20:1*cis* and 20:1*cis*|20:1*cis* were the main identified species (**Fig**. **7A**, peak masses of PGs with 2 eFAs in green; **Table S2**). The remaining 75-80% of PGs comprised principally *ai*15 and eFAs, reflecting decreased straight chain saturated fatty acid synthesis. eFA species were elongated, generating 19:1*tr* and 20:1*cis*, while no elongated species of *ai*15 were detected, suggesting preferred elongation of the unsaturated eFAs (**Fig. S5, Table S2**).

In the presence of FASII inhibitors AFN-1252 or triclosan, the transition from endogenous to exclusively exogenous fatty acids was concommitant with outgrowth from latency starting at 8 h post-treatment; this transition was complete at 10 h (**Fig. 6**). PG composition also shifted in parallel to comprise 18:1*cis*|18:1*cis*, 17:1*tr*|17:1*tr*, and 18:1*cis*|17:1*tr* as predominant species (**Fig. 6** and **7B**, **Fig. S6**, **Tables S3** and **S4**).

These results demonstrate that *S. aureus* phospholipid-synthesizing enzymes do not have a strict fatty acid substrate requirement at either PG position, as seen in the absence of anti-FASII selection. In particular, the PG 2-position, reported to be specific for *ai*15, can also be occupied by other fatty acids, here C17:1*tr* and C18:1*cis*, indicating that non-staphylococcal fatty acids are

competitive substrates for phospholipid synthases. The demonstration of phospholipid plasticity in conditions of low stress revises the current view of *S. aureus* phospholipid enzyme stringency.

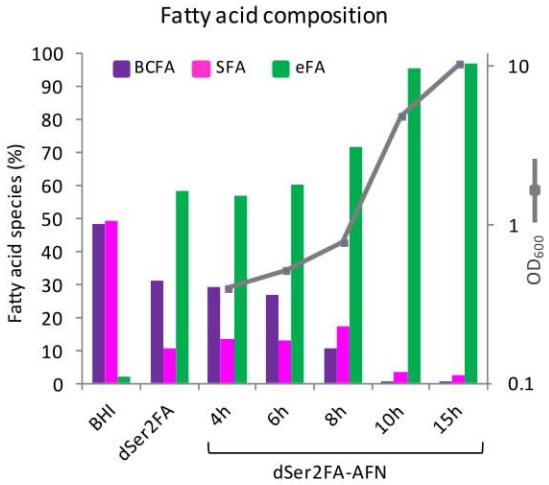


Fig. 6. *S. aureus* growth kinetics and incorporation of 17:1tr and 18:1cis eFAs without and with AFN-1252 antibiotic.

USA300 dSer2FA cultures were prepared with 10% delipidated serum (dSer) and C17:1*tr* and C18:1*cis.* dSer2FA-AFN contains FASII inhibitor AFN-1252 (0.5 µg/ml, equivalent to >50 times the MIC; (Parsons et al., 2011)). OD_{600} readings during AFN-1252 growth are shown as grey boxes (right axis). Fatty acid composition is presented as the proportion of endogenous branched chain fatty acids (BCFAs C15, i15, *ai*15; purple), endogenous saturated (straight chain) fatty acids (SFAs C18, C20; pink), and eFAs (C17:1*tr* and C18:1*cis*, green); corresponding profiles are shown in Fig. S2. Results are the average of two experiments.

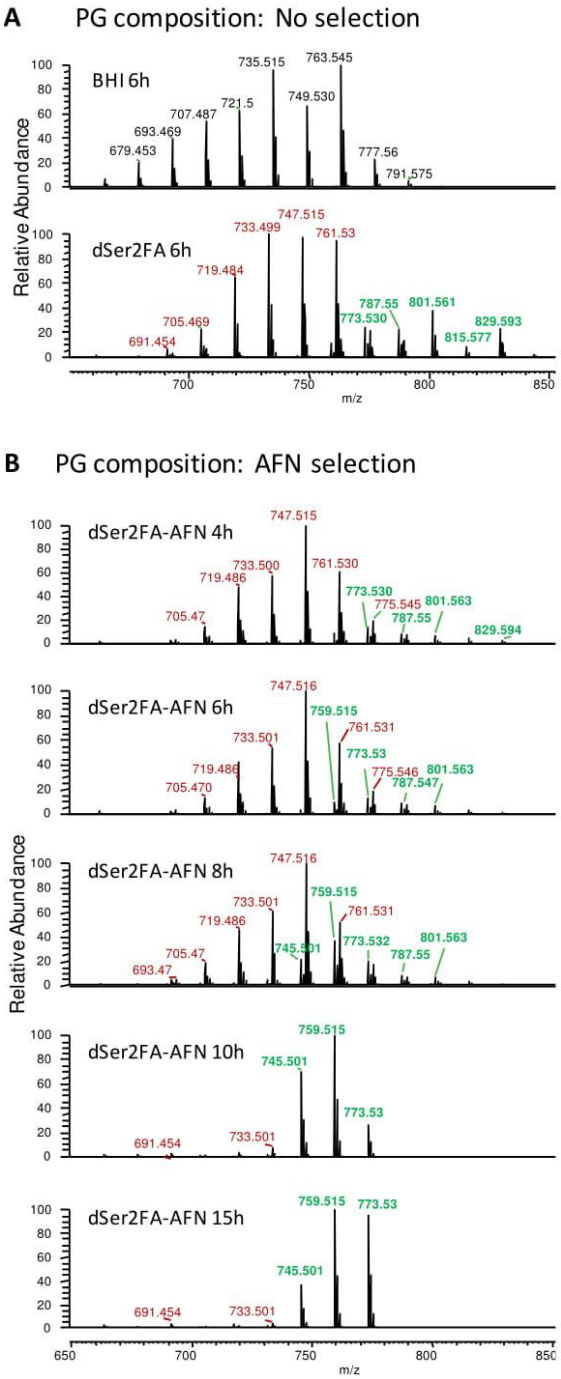


Fig. 7. eFAs replace *S. aureus* endogenous fatty acids in both phosphatidylglycerol (PG) positions in non-selective and selective growth.

Culture conditions are as in **Fig. 6**. PG masses are represented: in black, PG species with endogenous fatty acids in both positions; in red, PG species with one eFA and one endogenous fatty acid; in green, PG species with eFAs in both positions. Fatty acids comprising each major PG mass are listed in **Tables S2** and **S3**. **A.** PG profiles of *S. aureus* USA300 grown in dSer2FA in the absence of FASII antibiotic. About 20-25% of PG species in the non-selective conditions comprise eFAs at both conditions (dSer2FA), as estimated from peak heights. **B.** Kinetics of PG profile modifications during FASII bypass of AFN-1252 (AFN). Both PG positions are almost exclusively occupied by eFAs at 10 h post-AFN-1252 treatment.

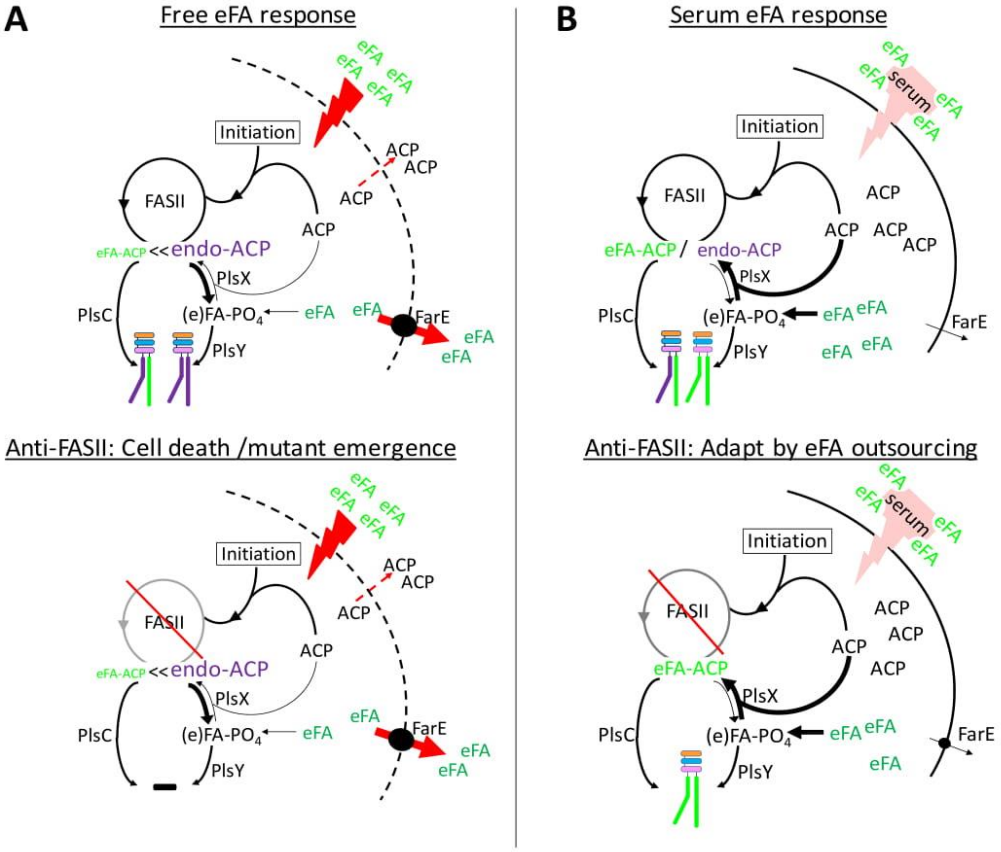


Fig. 8. Stress state modulates physical properties of wild type *S. aureus* that dictate eFA incorporation and FASII antibiotic adapation: a model.

A. Free eFAs. **Upper**: *S. aureus* responds by i- induction of fatty acid efflux *via* FarE and ii- leakage of small molecules including ACP (Alnaseri et al., 2015; Parsons et al., 2012) (see **Fig. 3**). In this condition membrane phospholipids comprise mainly endogenous fatty acids. **Lower**: FASII inhibitor blocks FASII, while compensatory eFA incorporation is diminished by eFA efflux and ACP leakage. In this condition, phospholipid synthesis is blocked. Bacteria die, and FASII initiation mutants emerge, which shift available ACP towards FASII bypass (Gloux et al., 2017; Morvan et al., 2016).

B. eFAs in serum. **Upper**: Host factors lessen eFA-induced stress responses. Serum and other host components bind eFAs (Lacey and Lord, 1981); low stress leads to higher intracellular ACP and eFAs (**Fig. 3**). Entering eFAs are phosphorylated (Parsons et al., 2014), and the products, together with ACP, drive PlsX directionality to eFA-ACP production. eFA-ACP and endogenous fatty-acid-ACP compete for FASII elongation and phospholipid synthesis. eFAs are present at both positions in 20-25% of phospholipids or in one position for most remaining species (**Figs. 5,6**, and **S3**). **Lower**: Anti-FASII inhibits *ai*15 synthesis, and eFAs are predominant phospholipid constituents. In this model and consistent with our data, PlsC does not discriminate between endogenous and foreign-derived acyl-ACP species.

eFA, exogenous fatty acids (green); endo-ACP, endogenous fatty acids linked to ACP (purple). Phospholipids ("π" form) comprise eFAs (green lines) and/or endogenous fatty acids (purple lines). eFA-ACP and endo-ACP pools are presented in large and small type, according to abundance. Thick black arrows represent favored reactions, thin black arrows, reduced reactions. Dashed quarter circle, permeable membrane; solid quarter circle, intact membrane. PlsX and PlsY, and PlsC, are required for fatty acid insertion in the 1- and 2-phospholipid positions, respectively (Zhang and Rock, 2008).

Discussion

Bacterial metabolism and environmental stress play unquestionable roles in the outcome of antimicrobial treatments. Antibiotic resistence has mostly been associated with reduced metabolism, *e.g.*, in small colony variants that are defective in respiration, or in persister cells (Chuard et al., 1997; Lewis, 2007). Nutrient stimulation of persister cells resensitizes bacteria to aminoglycosides by restoring proton motive force for their uptake (Allison et al., 2011). Additionally, environmental oxidative stress induces multi-drug efflux pumps, which facilitates emergence of persisters (Lee and Collins, 2011; Wu et al., 2012).

Whereas slow growth and stress characterize persister cell and mutant emergence, we showed here that FASII antibiotic adaptation by fatty acid outsourcing occurs in conditions of low stress, and results in outgrowth of robust, antibiotic-adapted cells. This response defines a distinct paradigm for antibiotic adaptation by environmental metabolite compensation. Metabolite salvage is a common bacterial strategy and sets a logical limit in the choice of targets to exploit for antimicrobial drug development.

The condition-dependent use of eFAs by *S. aureus* is suggestive of a bet-hedging strategy. It is distinct from fatty acid auxotrophs such as mycoplasma and certain lactobacilli, which fully rely on eFAs for growth and survival in their biotopes (Fernandez et al., 2008; Kornspan and Rottem, 2012), or from fatty acid prototrophs like *S. agalactiae*, which preferentially use eFAs, even *in vivo* (Brinster et al., 2009). It also differs from *Mycobacterium tuberculosis* and related Actinomycetes, which reportedly use eFAs, but cannot fulfill their fatty acid requirements for very long chain mycolic acids (Khuller et al., 1983; Marrakchi et al., 2000). Since outgrowth concerns a bacterial subpopulation that becomes dominant during antibiotic selection, it is likely that further fitness mutations occur during selection, or that bacteria revert to normal growth when selection is lifted.

Potential impact of lipophile outsourcing on efficacy of other lipophile-targeted antibiotics

Exogenous lipophiles are diffusible in membranes, and might more generally compromise efficacy of antimicrobials that target endogenous lipophile synthesis pathways. For example, menaquinone (MK) synthetic enzymes are candidate targets for anti-*S. aureus* antimicrobials (Matarlo et al., 2016). However, gut bacteria and plant-based foods may liberate MKs and/or their precursors that complement MK deficiencies as shown *in vitro* (Franza et al., 2016; Matarlo et al., 2016; Rezaiki et al., 2008; Wakeman et al., 2012; Yamamoto et al., 2006b). We suggest that MK outsourcing *in vivo* should be considered when developing this class of antimicrobials.

Activity of lipophilic antibiotics may also be increased by bacterial eFA outsourcing. In a recent study, oleic acid supplementation of *S. aureus* medium potentiated action of daptomycin, a lipophilic last-resort antibiotic, presumably by increasing membrane fluidity and favoring drug insertion (Boudjemaa et al., 2018).

Host components rescue *S. aureus* from fatty acid stress and FASII inhibition

Antibacterial effects of free fatty acids on the skin barrier are attributed to bacterial membrane disruption, leading to leakage of small molecules, including ACP (Nicolaides, 1974) (Desbois and Smith, 2010; Parsons et al., 2012). *S. aureus* induces the fatty acid efflux pump FarE in response to eFAs (Alnaseri et al., 2015). Within the host, however, components such as serum dampen these stress-related effects and favor eFA incorporation (**Figs 1, 2** and **4**). These effects relate to fatty-acid-binding capacity of albumin, a major serum component (Lacey and Lord, 1981; Litus et al., 2017; Nemashkalova et al., 2017); albumin addition rather than serum at equivalent concentrations also led to *S. aureus* adaptation to triclosan (data not shown). Thus ironically, host factors provide the protective environment that promotes *S. aureus* adaptation to FASII antibiotics.

Proposed model for the shift from endogenous fatty acids to eFAs in low fatty acid stress

Low fatty acid stress reveals the versatility of *S. aureus* membrane phospholipid enzymes and explains adaptation to FASII antibiotics. Physical differences of *S. aureus* in high *versus* low fatty acid stress are highlighted in the following model (**Fig. 8**): **I-** Without serum: In non-selective conditions, free eFAs generate a membrane stress response, resulting in lower intracellular eFA (*via* efflux) and ACP (*via* leakage) ((Alnaseri et al., 2015; Parsons et al., 2012); **Fig. 8A upper**). Active FASII produces endogenous fatty acids that dominate the acyl-ACP pool and allow *S. aureus* growth. When FASII antibiotic is added, FarE-mediated eFA efflux and low ACP pools impede eFA utilization (**Fig. 8A lower**). Insufficient membrane synthesis leads to cell death or FASII gene mutations that shunt ACP towards eFA incorporation (Morvan et al., 2016). The high frequency mutations that occur in fatty acid stress conditions constitute part of the bacterial response to FASII antibiotics (Gloux et al., 2017).

II- With serum: The above effects of eFAs are neutralized (**Figs. 3** and **8B**). In non-selective growth, higher intracellular eFA and ACP pools drive phospholipid enzyme PlsX directionality towards eFA-ACP synthesis, seen by elongation of such products, and eFAs occupy both positions of membrane phospholipids (**Fig. 8B upper**). When anti-FASII shuts off endogenous synthesis, phospholipids comprise exclusively eFAs upon cell outgrowth (**Fig. 8B lower**). The demonstration that eFAs occupy both phospholipid positions even during *ai*15 synthesis (**Fig. 7A** and **Table S2**) rules out the

"phospholipid *ai*15 stringency" hypothesis that is the rationale for anti-FASII development to treat *S. aureus* infection.

Cell division, the latency bottleneck during *S. aureus* adaptation to FASII antibiotics?

The finding that eFAs occupy both phospholipid positions in the absence of selection indicates that eFA incorporation *per se* is not limiting for bacterial outgrowth during anti-FASII selection. The frequent appearance of tetrad bacteria in SerFA-anti-FASII conditions (**Fig. 2**) gives evidence that cell division stalling might cause latency. Phospholipids, lipoteichoic acid, lipoprotein, metabolic intermediates, and pigments are all modified by eFAs (Agarwal et al., 2012; Fischer, 1994; Pelz et al., 2005; Percy and Grundling, 2014)). Since they are implicated in basic bacterial functions (Cybulski et al., 2010; Diomande et al., 2015; Mercier et al., 2013; Vadia et al., 2017; Zhu et al., 2005), their modification could induce cell division stalling. However, this hypothesis is flawed, as i- *S. aureus fabD* conditional mutants grow without a lag when shifted from BHI to FA-Tric medium (Morvan et al., 2016), and ii- latency occurs *prior* to the surge in eFA replacement (**Fig. 6** and **Fig S6**). Alternatively, FASII inhibitors may alter relative proportions of FASII enzymes, which might delay cell division. For example, studies in *E. coli* and *Bacillus subtilis* showed that fatty acid insufficiencies impact growth capacity (Vadia and Levin, 2015; Yao et al., 2012). A third possibility is that FASII inhibitors trigger regulatory responses that block cell division, such as stringent and/or SOS-response induction (Adams and Errington, 2009; Battesti and Bouveret, 2006; Ferullo and Lovett, 2008; Vadia et al., 2017). Mechanisms based on these hypotheses are being investigated. Identification of latency determinants open perspectives for combinatorial antibiotic development.

***S. aureus* road to parasitism**

The present work demonstrating *S. aureus* adaptation to FASII antibiotics, and previous identification of fatty acid auxotrophs among clinical isolates, together support earlier studies showing that FASII is not a requisite for Firmicute pathogen survival during infection (Brinster et al., 2009; Gloux et al., 2017). Intriguingly, recent studies of wall-less L-form bacteria reveal that this potentially primitive cell form may be generated and multiply in the host, as shown in an insect model (Kawai et al., 2018). As membrane fatty acids are scavenged from the animal host, and cell wall components are dispensable, it will be fascinating to investigate whether the host can support L-forms that are totally dependent on their environment, by using eFAs to maintain bacterial membranes in a wall-less, FASII-free form.

Materials and Methods

Bacterial strains

S. aureus Newman and RN4220 strains were from our laboratory collection (Herbert et al., 2010). JE2 USA300 FPR3757 (referred to as USA300), and derivatives were obtained from the Nebraska library of transposon insertions (University of Nebraska Medical Center), and generously supplied by BEI resources (Fey et al., 2013). Strains used contained insertions in the following genes: *spa* (SAUSA300_0113 encoding immunoglobulin G binding protein A), SAUSA300_1177, SAUSA300_1236, SAUSA300_1684, SAUSA300_0226, and SAUSA300_0242. Plasmid pCM11 expressing "superfolder GFP" (Lauderdale et al., 2010; Malone et al., 2009) was established in the USA300 strain *via* a first DNA transformation in the restriction minus *S. aureus* strain RN4220 using erythromycin 5 µg/ml for selection.

Growth media

BHI medium was used for *S. aureus* growth except in media containing liver extracts. Organ extracts were prepared as described (Morvan et al., 2016) and used at 3% final concentration. Fatty acids (Laradon, Sweden) were prepared as 100 mM stocks in dimethyl sulfoxide (DMSO). The three fatty acid mixture (referred to as « 3FA ») comprising C14:0 (myristic acid), C16:0 (palmitic acid), and C18:1*cis* (oleic acid) was prepared in a 1:1:1 ratio (0.17 mM each). The two fatty acid mixture comprising C17:1*trans* and C18:1*cis* was used at a 1:1 ratio (0.25 mM each). Newborn calf serum (Sigma-Aldrich, France), or delipidated calf serum (Eurobio, France) was added to growth medium (10% final concentration) as indicated. Triclosan (referred to as "Tric"; Irgasan; Sigma-Aldrich) was added at 250 ng/ml and 500 ng/ml in medium without and with serum respectively; this corresponds to 15-30 times the minimum inhibitory concentrations (MIC) as determined on BHI medium (Morvan et al., 2016). AFN-1252 (referred to as "AFN"; MedChem Express) was added at 500 ng/ml in all media, which corresponds to about 100-fold the reported *S. aureus* MIC (~4-8 ng/ml; (Parsons et al., 2011)). FASII inhibitors were prepared in DMSO.

Determination of *S. aureus* fatty acid profiles

Aliquots of *S. aureus* cultures (routinely an OD_{600} equivalent ≥1 was used) were centrifuged and washed once in 0.9% NaCl containing 0.02% Triton X-100, followed by two washes in 0.9% NaCl. Whole cell esterified fatty acid determinations were then done as described (Yamamoto et al., 2006a). Briefly, cell pellets were treated with 0.5 ml of 1N sodium methoxide in methanol. Heptane (200 µl) was then added, together with methyl-10-undecenoate (Sigma-Aldrich) as internal standard, vortexed for 1 min, and centrifuged. Fatty acid methyl esters were recovered in the heptane phase.

Analyses were performed in a split-splitless injection mode on an AutoSystem XL Gas Chromatograph (Perkin-Elmer) equipped with a ZB-Wax capillary column (30m x 0.25 mm x 0.25 µm; Phenomenex, France). Data were recorded and analysed by TotalChrom Workstation (Perkin-Elmer). *S. aureus* fatty acid peaks were detected between 12 and 32 min of elution.

Fluorescence microscopy

Bacteria were grown in BHI, FA, Ser-FA to OD_{600} = 0.5-1, or FA-Tric and SerFA-Tric for 6 hours. Cells (OD_{600} equivalent of 10-20) were centrifuged and washed once in phosphate buffered saline. Syto9™ (0.5 µl sample of a 5 mM solution in DMSO; Thermo Fischer Scientific) and propidium iodide (3 µl of 1.5 mM solution in water; Sigma, France) were added to 30 µl samples for respectively live and permeabilized cell visualization. Cells were observed 10 min post-staining by fluorescent microscopy using a Zeiss AxioObserver Z1 inverted fluorescence microscope equipped with a Zeiss AxioCam MRm digital camera and Zeiss fluorescence filters. Images were processed with the Zeiss ZEN software package using a 38 HE Green Fluorescent Protein filter (excitation wavelength 450/490 nm; beam splitter, 495 nm; emission, 500/550 nm) and 45 Texas Red filter (excitation: 540/580 nm; beam splitter, 585 nm; emission, 595-668 nm). The numbers of live (green) and permeabilized (red) cells were counted manually. Dividing cells and tetrads were counted as single entities. Clusters that contained both vital and permeabilized cells (in FA-Tric and SerFA-Tric samples) were classified in a separate ("mixed") category. The proportion of tetrads among total cells was determined in the different culture conditions by manual counting; 15 micrographs from 3 independent cultures per condition were evaluated, based on a total of ~10 000 cell clusters per condition.

Biofilm conditions of microscopy

USA300 expressing sGFP (pCM11) was grown overnight in BHI containing erythromycin 5 µg/ml, and then used to inoculate BHI, FA and SerFA media at OD_{600} = 0.1. After 4 h growth, BHI cultures were diluted to OD_{600} = 0.003 for the BHI control. FA and SerFA cultures were diluted to to OD_{600} = 0.03 as inocula for respectively FA and FA-Tric, and for SerFA, SerFA-Tric, or SerFA-AFN cultures; higher inocula compensated for less adhesion in fatty-acid-containing media. Two hundred microliters of cultures were deposited on 96-well plates (polystyrene microclear, Greinerbio-one, France), and cells were incubated at 37°C for 1 hour to allow bacteria to settle. Culture supernatants were then removed by pipetting, and fresh medium was gently added prior to the start of 4D time lapse photography. Real-time confocal microscopy was performed with an inverted Leica High Content Screening SP8 equipped with a thermal cabinet regulated at 37°C (MIMA2 microscopy platform). Cells expressing GFP were excited at 488 nm with an argon laser set at 20% of its maximum power, and fluorescence emission was collected at 600 Hz on a hybrid detector in the range of 500–550 nm

using an x10 air objective (HCX PL Fluotar with a numerical aperture of 0.3). 3D acquisitions (1 image every 12 µm, 25 images per field) were taken every 15 minutes and assembled in 4D movies using Imaris software (Bitplane, Switzerland). The numbers of bacterial clusters at the start of growth were counted from 4 independent cultures using ImageJ (version 1.51s, National Institutes of Health, USA); 2 to 4 fields were visualized for each well. Colony emergence was evaluated by visual inspection on still images from videos, on at least 7 independent cultures from 4 independent experiments.

Genome sequencing

S. aureus USA300 and Newman strains were harvested after exit from latency phase for cultures grown in SerFA-Tric (12 h cultures; 3 independent samples for each strain),or in SerFA-AFN (15 h cultures; 3 independent samples of USA300). Cultures in BHI (one sample for each strain), and in SerFA (for USA300) were sequenced as references. DNA extractions were performed using the Qiagen "DNeasy® Blood & Tissue Kit", following manufacturer's protocol, except that cell pellets were first resuspended in 0.1 mg lysostaphin/ml Tris 10 mM Tris (AMBI, USA) and incubated 30 minutes at 37°C. Genomic DNA sequencing by Illumina HiSeq next generation sequencing was outsourced (GATC-Biotech, Konstanz, Germany). Coverage was estimated to be at least 70 for JE2 SerFA-Tric samples, and at least 400 for all other samples. The 2 x 150 paired-end reads were aligned and sequence variations were analysed using "Variation Analysis" method provided by Patricbrc.org. Bowtie2 (Patricbrc.org) was then used to align sequences and SAMtools to identify SNPs (Wattam et al., 2017). SNPs that differed in our control USA300 and Newman strains from those in the reference sequence (GenBank Nucleotide accession codes NC_007793.1 and NC_009641 respectively) were subtracted when screening for distinguishing features of the SerFA-Tric or SerFA-AFN cultures. Variants were identified as representing at least 80% of reads in sequences for which there were at least 10 reads.

ACP assessment by immunoblotting

An overnight BHI preculture of the USA300 *spa* SAUSA300_0113 strain (Fey et al., 2013) in BHI was used to inoculate BHI, FA, SerFA, FA-Tric, or SerFA-Tric media at OD_{600} = 0.1. Use of the *spa* mutant avoids IgG titration by Protein A; this strain was confirmed to behave like its parent with respect to FASII antibiotics. Cultures were harvested at OD_{600} = ~1 for BHI, FA, and SerFA, and after 2 h or 4 h for FA-Tric or SerFA-Tric. All samples were adjusted to equivalent OD_{600} values, and washed twice in TE-protease inhibitor (cOmplete Tablets, Mini *EASYpack* Roche, Germany, as per supplier's instructions), prior to lysis with Fastprep. Samples (20 µg per well as quantified by the Bradford Protein Assay kit (BioRad)) were treated for 3 min at 95°C and then loaded on 12.5% SDS-PAGE gels run at 150 volts for 2 h. Gels were then electro-transferred to PVDF membranes (0.2 mm; BioRad; 75mA) for 3 h on a

semi-dry transfer unit (Hoefer TE 70). Western blotting and exposure used an ECL kit (Perkin-Elmer) as per supplier's instructions. Rabbit anti-*S. aureus* ACP antibodies (Morvan et al., 2016) were used at 1:1,300 dilution.

Proteomic analyses of USA300 responses to anti-FASII

A USA300 *spa* SAUSA300_0113 strain overnight preculture in BHI was used to inoculate BHI, FA, SerFA, FA-Tric, or SerFA-Tric media at OD600 = 0.1. Culture extracts were prepared as described for Western blotting, and after verification of protein concentration and quality, 10 µg of each protein sample was run on SDS-PAGE using short migration. Further sample treatment by LC-MS/MS, and bioinformatics and statistical analyses of data are as described (Perez-Pascual et al., 2017). The reference genome GenBank Nucleotide accession code NC_007793.1 was used for identification. The Results section refers only to changes in SAUSA300_2489 expression. The complete list of proteins expressed in the five growth conditions will be made available on the Mendeley database (doi:10.17632/9292c75797.1) upon publication.

Extraction of polar membrane lipids

Lipid extractions were performed as described (Bligh and Dyer, 1959) with modifications (Thedieck et al., 2006). Briefly, freeze-dried cell material (100 mg) was extracted with 9.5 ml of chloroform-methanol 0.3% NaCl (1:2:0.8 v/v/v)at 80°C for 15 min and vortexed for 1 h at room temperature (RT). After centrifugation at 4000 rpm for 15 min (RT) supernatants were collected and cell debris was reextracted with 9.5 ml of the same mixture, and then vortexed for 30 min. After centrifugation, supernatants were pooled and 5 ml each of chloroform and 0.3% NaCl was added and mixed. Phase separation was achieved by centrifugation at 4000 rpm for 15 min (RT). The upper phase was discarded and the collected chloroform phase was evaporated to dryness under a nitrogen stream and stored at -20°C.

Phosphatidylglycerol analysis

The polar membrane lipid samples were injected in chloroform in a chromatographic system (ThermoFisher Scientific) including a Dionex U-3000 quaternary RSLC, a WPS-3000RS autosampler and a column oven. This system was coupled on-line to an LTQ-Orbitrap Velos Pro (ThermoFisher) for phosphatidylglycerol species identification. For liquid chromatography, lipid separation was carried out on a PVA-Sil column (150 x 2.1 mm I.D., 120 A) (YMC Europe GmbH) with a 10x2 mm guard column packed with the same material. Column temperature was thermostatically controlled at 35°C. The chromatographic method was derived from a previous method (Imbert et al., 2012a; Imbert et al., 2012b) and used as described (Moulin et al., 2015).

Mass spectrometry

The LTQ-Orbitrap Velos Pro is equipped with an H-ESI II probe. Spray voltage was set at 3.3 kV. Heater temperature of the probe was set at 200°C. Sheath gas, auxiliary gas and sweep gas flow rates were set at 20, 8 and 0 (arbitrary unit) respectively. Capillary temperature was set at 325°C and S-lens RF level at 60%. Analysis was performed in negative mode to obtain structural information on phosphatidylglycerol fatty chains. This mass spectrometer is equipped with two analyzers: a double linear ion trap (LTQ) for fragmentation at low resolution and an orbital trap for high resolution detection. The detection was performed either in full MS Scan with 100,000 resolution and data dependent MS^2 and MS^3 with collision induced dissociation (CID; collision energy set at 35).

Phospholipid species were separated by polar head properties as described (Imbert et al., 2012b). Retention time was used for polar head identification and compared to commercial standards. Phospholipid identification was performed as described (Pulfer and Murphy, 2003) using high resolution mass detection in full scan mode and MS^2/MS^3 fragmentation in data dependant mode. Phosphatidylglycerol (PG) species and their fatty acid consitutents are presented.

Data availability

Genome sequence data have been deposited in the European Nucleotide Archive and can be accessed at http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB24433. The complete list of proteins from the proteomic study will be made available on the Mendeley database (doi:10.17632/9292c75797.1) upon publication. The authors declare that all other data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files, or from the corresponding author upon request.

Acknowledgements

Nebraska Transposon Mutant Library (NTML) strains were generously provided by the Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA), prepared by BEI Resources, NIAID, NIH. Michel Gohar (Micalis) gave us valuable advice for fluorescent microscopy studies. We are grateful to P. Casedesus (Univ. Sevilla, Spain), and B. Michel and P. Bouloc (I2BC, France) for discussion of adaptation mechanisms. We thank C. Poyart (Hôpital Cochin, France) and P. Trieu-Cuot (Pasteur Institute, France) for stimulating discussion of this work. R. Boudjemaa, E. Borezée-Durant, D. Lechardeur, and P. Gaudu (MicrobAdapt team) offered important suggestions and advice throughout this project. GK received a doctoral grant from the French ministry (GK) and AP was funded by a postdoctoral grant from the regional DIM-Malinf. We gratefully acknowledge the Agence Nationale

de la Recherche funding for StaphEscape project ANR-13001038 and the Fondation pour la Recherche Medicale DBF20161136769 for funding.

Author Contributions

All authors carried out experiments. GK, CM, KG, AS, GK, AG analyzed data. KG, GL, AG contributed to experimental design and project conception. CM, KG, AG drafted the manuscript.

Declaration of Interests

The authors declare no competing interests.

References

Adams, D.W., and Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. Nature reviews Microbiology *7*, 642-653.

Agarwal, V., Lin, S., Lukk, T., Nair, S.K., and Cronan, J.E. (2012). Structure of the enzyme-acyl carrier protein (ACP) substrate gatekeeper complex required for biotin synthesis. Proc Natl Acad Sci USA *109*, 17406-17411.

Albanesi, D., Reh, G., Guerin, M.E., Schaeffer, F., Debarbouille, M., Buschiazzo, A., Schujman, G.E., de Mendoza, D., and Alzari, P.M. (2013). Structural basis for feed-forward transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Staphylococcus aureus*. PLoS pathogens *9*, e1003108.

Allison, K.R., Brynildsen, M.P., and Collins, J.J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. Nature *473*, 216-220.

Alnaseri, H., Arsic, B., Schneider, J.E., Kaiser, J.C., Scinocca, Z.C., Heinrichs, D.E., and McGavin, M.J. (2015). Inducible Expression of a Resistance-Nodulation-Division-Type Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Provides Resistance to Linoleic and Arachidonic Acids. Journal of bacteriology *197*, 1893-1905.

Babu, M., Greenblatt, J.F., Emili, A., Strynadka, N.C., Reithmeier, R.A., and Moraes, T.F. (2010. Structure of a SLC26 anion transporter STAS domain in complex with acyl carrier protein: implications for *E. coli* YchM in fatty acid metabolism. Structure *18*, 1450-1462.

Balemans, W., Lounis, N., Gilissen, R., Guillemont, J., Simmen, K., Andries, K., and Koul, A. (2010). Essentiality of FASII pathway for *Staphylococcus aureus*. Nature *463*, E3; discussion E4.

Battesti, A., and Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. Molecular microbiology *62*, 1048-1063.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol *37*, 911-917.

Boudjemaa, R., Cabriel, C., Dubois-Brissonnet, F., Bourg, N., Dupuis, G., Gruss, A., Leveque-Fort, S., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M.P., and Steenkeste, K. (2018). Failure of daptomycin to kill *Staphylococcus aureus*: impact of bacterial membrane fatty acid composition. Antimicrobial agents and chemotherapy *In Press*.

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N.Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Nature reviews Microbiology *14*, 320-330.

Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., and Poyart, C. (2009). Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. Nature *458*, 83-86.

Brinster, S., Lamberet, G., Staels, B., Trieu-Cuot, P., Gruss, A., and Poyart, C. (2010). Essentiality of FASII pathway for *Staphylococcus aureus*. Reply. Nature *463*, E4-E5.

Chuard, C., Vaudaux, P.E., Proctor, R.A., and Lew, D.P. (1997). Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. The Journal of antimicrobial chemotherapy *39*, 603-608.

Cybulski, L.E., Martin, M., Mansilla, M.C., Fernandez, A., and de Mendoza, D. (2010). Membrane thickness cue for cold sensing in a bacterium. Current biology : CB *20*, 1539-1544.

Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev *74*, 417-433.

Desbois, A.P., and Smith, V.J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. Applied microbiology and biotechnology *85*, 1629-1642.

Diomande, S.E., Nguyen-The, C., Guinebretiere, M.H., Broussolle, V., and Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in Bacillus environmental adaptation. Front Microbiol *6*, 813.

Dubnau, D., and Losick, R. (2006). Bistability in bacteria. Molecular microbiology *61*, 564-572.

Escaich, S., Prouvensier, L., Saccomani, M., Durant, L., Oxoby, M., Gerusz, V., Moreau, F., Vongsouthi, V., Maher, K., Morrissey, I*., et al.* (2011). The MUT056399 inhibitor of FabI is a new antistaphylococcal compound. Antimicrobial agents and chemotherapy *55*, 4692-4697.

Fernandez, A., Ogawa, J., Penaud, S., Boudebbouze, S., Ehrlich, D., van de Guchte, M., and Maguin, E. (2008). Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*. Proteomics *8*, 3154-3163.

Ferullo, D.J., and Lovett, S.T. (2008). The stringent response and cell cycle arrest in *Escherichia coli*. PLoS genetics *4*, e1000300.

Fey, P.D., Endres, J.L., Yajjala, V.K., Widhelm, T.J., Boissy, R.J., Bose, J.L., and Bayles, K.W. (2013). A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. mBio *4*, e00537-00512.

Fischer, W. (1994). Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. Medical microbiology and immunology *183*, 61-76.

Franza, T., Delavenne, E., Derre-Bobillot, A., Juillard, V., Boulay, M., Demey, E., Vinh, J., Lamberet, G., and Gaudu, P. (2016). A partial metabolic pathway enables group b streptococcus to overcome quinone deficiency in a host bacterial community. Molecular microbiology *102*, 81-91.

Giles, D.K., Hankins, J.V., Guan, Z., and Trent, M.S. (2011). Remodelling of the *Vibrio cholerae* membrane by incorporation of exogenous fatty acids from host and aquatic environments. Molecular microbiology *79*, 716-728.

Gloux, K., Guillemet, M., Soler, C., Morvan, C., Halpern, D., Pourcel, C., Vu Thien, H., Lamberet, G., and Gruss, A. (2017). Clinical Relevance of Type II Fatty Acid Synthesis Bypass in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy *61*, 61:e02515-02516.

Greenway, D.L., and Dyke, K.G. (1979). Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. Journal of general microbiology *115*, 233-245.

Herbert, S., Ziebandt, A.K., Ohlsen, K., Schafer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R., and Gotz, F. (2010). Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. Infection and immunity *78*, 2877-2889.

Hunt, T., Kaplan, N., and Hafkin, B. (2016). Safety, tolerability and pharmacokinetics of multiple oral doses of AFN-1252 administered as immediate release (IR) tablets in healthy subjects. Journal of chemotherapy *28*, 164-171.

Imbert, L., Gaudin, M., Libong, D., Touboul, D., Abreu, S., Loiseau, P.M., Laprevote, O., and Chaminade, P. (2012a). Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for a lipidomic analysis of Leishmania donovani. J Chromatogr A *1242*, 75-83.

Imbert, L., Ramos, R.G., Libong, D., Abreu, S., Loiseau, P.M., and Chaminade, P. (2012b). Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. Anal Bioanal Chem *402*, 1169-1182.

Kaplan, N., Awrey, D., Bardouniotis, E., Berman, J., Yethon, J., Pauls, H.W., and Hafkin, B. (2013a). In vitro activity (MICs and rate of kill) of AFN-1252, a novel FabI inhibitor, in the presence of serum and in combination with other antibiotics. Journal of chemotherapy *25*, 18-25.

Kaplan, N., Garner, C., and Hafkin, B. (2013b). AFN-1252 in vitro absorption studies and pharmacokinetics following microdosing in healthy subjects. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences *50*, 440-446.

Karlowsky, J.A., Kaplan, N., Hafkin, B., Hoban, D.J., and Zhanel, G.G. (2009). AFN-1252, a FabI inhibitor, demonstrates a Staphylococcus-specific spectrum of activity. Antimicrobial agents and chemotherapy *53*, 3544-3548.

Kawai, Y., Mickiewicz, K., and Errington, J. (2018). Lysozyme Counteracts beta-Lactam Antibiotics by Promoting the Emergence of L-Form Bacteria. Cell *172*, 1038-1049 e1010.

Kennedy, A.D., Otto, M., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Chen, L., Mathema, B., Mediavilla, J.R., Byrne, K.A., Parkins, L.D., Tenover, F.C., *et al.* (2008). Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. Proc Natl Acad Sci USA *105*, 1327-1332.

Khuller, G.K., Taneja, R., and Nath, N. (1983). Effect of fatty acid supplementation on the lipid composition of *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, grown at 27 degrees and 37 degrees C. J Appl Bacteriol *54*, 63-68.

Kornspan, J.D., and Rottem, S. (2012). The phospholipid profile of mycoplasmas. J Lipids *2012*, 640762.

Lacey, R.W., and Lord, V.L. (1981). Sensitivity of staphylococci to fatty acids: novel inactivation of linolenic acid by serum. Journal of medical microbiology *14*, 41-49.

Lauderdale, K.J., Malone, C.L., Boles, B.R., Morcuende, J., and Horswill, A.R. (2010). Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. J Orthop Res *28*, 55-61.

Lee, H.H., and Collins, J.J. (2011). Microbial environments confound antibiotic efficacy. Nat Chem Biol *8*, 6-9.

Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. Nature reviews Microbiology *5*, 48-56.

Litus, E.A., Permyakov, S.E., Uversky, V.N., and Permyakov, E.A. (2017). Intrinsically Disordered Regions in Serum Albumin: What Are They For? Cell Biochem Biophys.

Lowy, F.D. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: where is it coming from and where is it going? JAMA internal medicine *173*, 1978-1979.

Majerus, P.W., Alberts, A.W., and Vagelos, P.R. (1964). The Acyl Carrier Protein of Fatty Acid Synthesis: Purification, Physical Properties, and Substrate Binding Site. Proc Natl Acad Sci USA *51*, 1231-1238.

Malone, C.L., Boles, B.R., Lauderdale, K.J., Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., and Horswill, A.R. (2009). Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. Journal of microbiological methods *77*, 251-260.

Marrakchi, H., Laneelle, G., and Quemard, A. (2000). InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. Microbiology *146 (Pt 2)*, 289-296.

Matarlo, J.S., Lu, Y., Daryaee, F., Daryaee, T., Ruzsicska, B., Walker, S.G., and Tonge, P.J. (2016). A Methyl 4-Oxo-4-phenylbut-2-enoate with in Vivo Activity against MRSA that Inhibits MenB in the Bacterial Menaquinone Biosynthesis Pathway. ACS Infect Dis *2*, 329-340.

Mercier, R., Kawai, Y., and Errington, J. (2013). Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. Cell *152*, 997-1007.

Morvan, C., Halpern, D., Kenanian, G., Hays, C., Anba-Mondoloni, J., Brinster, S., Kennedy, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., Lamberet, G.*, et al.* (2016). Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials. Nature communications *7*, 12944.

Morvan, C., Halpern, D., Kenanian, G., Pathania, A., Anba-Mondoloni, J., Lamberet, G., Gruss, A., and Gloux, K. (2017). The *Staphylococcus aureus* FASII bypass escape route from FASII inhibitors. Biochimie *141*, 40-46.

Moulin, M., Solgadi, A., Veksler, V., Garnier, A., Ventura-Clapier, R., and Chaminade, P. (2015). Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. Biol Sex Differ *6*, 20.

Nemashkalova, E.L., Permyakov, E.A., Permyakov, S.E., and Litus, E.A. (2017). Modulation of linoleic acid-binding properties of human serum albumin by divalent metal cations. Biometals *30*, 341-353.

Nicolaides, N. (1974). Skin lipids: their biochemical uniqueness. Science *186*, 19-26.

Park, H.S., Yoon, Y.M., Jung, S.J., Yun, I.N., Kim, C.M., Kim, J.M., and Kwak, J.H. (2007). CG400462, a new bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) inhibitor. International journal of antimicrobial agents *30*, 446-451.

Parsons, J.B., Frank, M.W., Subramanian, C., Saenkham, P., and Rock, C.O. (2011). Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA *108*, 15378-15383.

Parsons, J.B., Yao, J., Frank, M.W., Jackson, P., and Rock, C.O. (2012). Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology *194*, 5294-5304.

Pelz, A., Wieland, K.P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K., and Gotz, F. (2005). Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. The Journal of biological chemistry *280*, 32493-32498.

Percy, M.G., and Grundling, A. (2014). Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. Annu Rev Microbiol *68*, 81-100.

Perez-Pascual, D., Rochat, T., Kerouault, B., Gomez, E., Neulat-Ripoll, F., Henry, C., Quillet, E., Guijarro, J.A., Bernardet, J.F., and Duchaud, E. (2017). More Than Gliding: Involvement of GldD and GldG in the Virulence of Flavobacterium psychrophilum. Front Microbiol *8*, 2168.

Pulfer, M., and Murphy, R.C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. Mass Spectrom Rev *22*, 332-364.

Rezaiki, L., Lamberet, G., Derre, A., Gruss, A., and Gaudu, P. (2008). Lactococcus lactis produces short-chain quinones that cross-feed Group B Streptococcus to activate respiration growth. Molecular microbiology *67*, 947-957.

Saito, H.E., Harp, J.R., and Fozo, E.M. (2014). Incorporation of exogenous fatty acids protects *Enterococcus faecalis* from membrane-damaging agents. Applied and environmental microbiology *80*, 6527-6538.

Sato, M., Tsuchiya, H., Tani, H., Yamamoto, K., Yamaguchi, R., Nitta, H., Kanematsu, N., Namikawa, I., and Takagi, N. (1991). Incorporation of fatty acids by Streptococcus mutans. FEMS microbiology letters *65*, 117-121.

Sause, W.E., Copin, R., O'Malley, A., Chan, R., Morrow, B.J., Buckley, P.T., Fernandez, J., Lynch, A.S., Shopsin, B., and Torres, V.J. (2017). *Staphylococcus aureus* strain Newman D2C contains mutations in major regulatory pathways that cripple its pathogenesis. Journal of bacteriology.

Schiebel, J., Chang, A., Lu, H., Baxter, M.V., Tonge, P.J., and Kisker, C. (2012). *Staphylococcus aureus* FabI: inhibition, substrate recognition, and potential implications for in vivo essentiality. Structure *20*, 802-813.

Schiebel, J., Chang, A., Shah, S., Lu, Y., Liu, L., Pan, P., Hirschbeck, M.W., Tareilus, M., Eltschkner, S., Yu, W.*, et al.* (2014). Rational design of broad spectrum antibacterial activity based on a clinically relevant enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase inhibitor. The Journal of biological chemistry *289*, 15987-16005.

SenGupta, D.J., Cummings, L.A., Hoogestraat, D.R., Butler-Wu, S.M., Shendure, J., Cookson, B.T., and Salipante, S.J. (2014). Whole-genome sequencing for high-resolution investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and genome plasticity. Journal of clinical microbiology *52*, 2787-2796.

Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., and Lewis, K. (2006). Persisters: a distinct physiological state of E. coli. BMC microbiology *6*, 53.

Thedieck, K., Hain, T., Mohamed, W., Tindall, B.J., Nimtz, M., Chakraborty, T., Wehland, J., and Jansch, L. (2006). The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on Listeria monocytogenes. Molecular microbiology *62*, 1325-1339.

Tsuji, B.T., Harigaya, Y., Lesse, A.J., Forrest, A., and Ngo, D. (2013). Activity of AFN-1252, a novel FabI inhibitor, against *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamic model simulating human pharmacokinetics. Journal of chemotherapy *25*, 32-35.

Vadia, S., and Levin, P.A. (2015). Growth rate and cell size: a re-examination of the growth law. Current opinion in microbiology *24*, 96-103.

Vadia, S., Tse, J.L., Lucena, R., Yang, Z., Kellogg, D.R., Wang, J.D., and Levin, P.A. (2017). Fatty Acid Availability Sets Cell Envelope Capacity and Dictates Microbial Cell Size. Current biology : CB *27*, 1757-1767 e1755.

Wakeman, C.A., Hammer, N.D., Stauff, D.L., Attia, A.S., Anzaldi, L.L., Dikalov, S.I., Calcutt, M.W., and Skaar, E.P. (2012). Menaquinone biosynthesis potentiates haem toxicity in *Staphylococcus aureus*. Molecular microbiology *86*, 1376-1392.

Wang, J., Kodali, S., Lee, S.H., Galgoci, A., Painter, R., Dorso, K., Racine, F., Motyl, M., Hernandez, L., Tinney, E., *et al.* (2007). Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 7612-7616.

Wang, J., Soisson, S.M., Young, K., Shoop, W., Kodali, S., Galgoci, A., Painter, R., Parthasarathy, G., Tang, Y.S., Cummings, R., *et al.* (2006). Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. Nature *441*, 358-361.

Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., *et al.* (2017). Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. Nucleic acids research *45*, D535-D542.

Wu, Y., Vulic, M., Keren, I., and Lewis, K. (2012). Role of oxidative stress in persister tolerance. Antimicrobial agents and chemotherapy *56*, 4922-4926.

Yamamoto, Y., Pargade, V., Lamberet, G., Gaudu, P., Thomas, F., Texereau, J., Gruss, A., Trieu-Cuot, P., and Poyart, C. (2006a). The Group B Streptococcus NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. Molecular microbiology *62*, 772-785.

Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., and Gaudu, P. (2006b). Roles of environmental heme, and menaquinone, in *Streptococcus agalactiae*. Biometals *19*, 205-210.

Yao, Z., Davis, R.M., Kishony, R., Kahne, D., and Ruiz, N. (2012). Regulation of cell size in response to nutrient availability by fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA *109*, E2561-2568.

Yum, J.H., Kim, C.K., Yong, D., Lee, K., Chong, Y., Kim, C.M., Kim, J.M., Ro, S., and Cho, J.M. (2007). In vitro activities of CG400549, a novel FabI inhibitor, against recently isolated clinical staphylococcal strains in Korea. Antimicrobial agents and chemotherapy *51*, 2591-2593.

Zhang, Y.M., and Rock, C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nature reviews Microbiology *6*, 222-233.

Zhu, K., Ding, X., Julotok, M., and Wilkinson, B.J. (2005). Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C15:0 fatty acid required for low-temperature growth of Listeria monocytogenes. Applied and environmental microbiology *71*, 8002-8007.

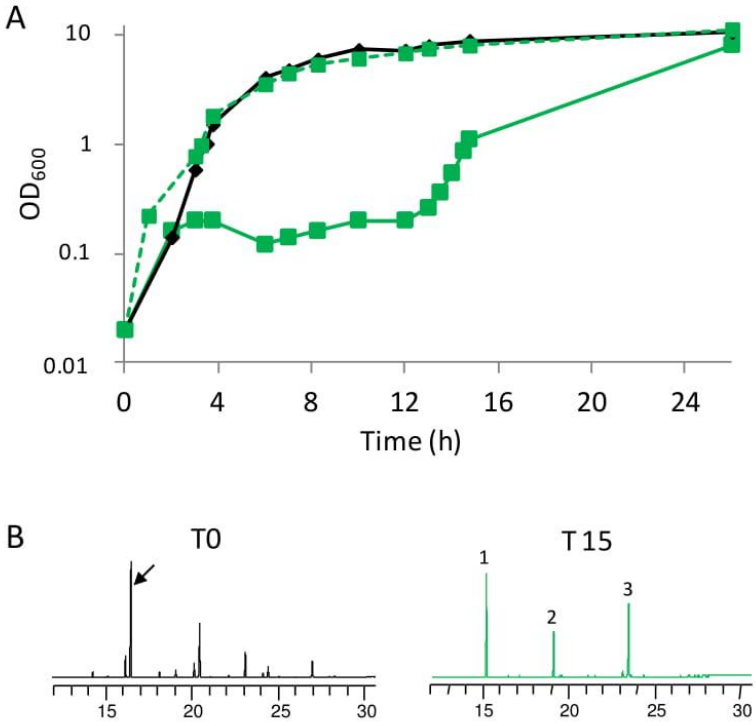


Fig. S1. *S. aureus* bypass of a FASII-targeted antibiotic is accelerated in serum.
S. aureus Newman strain was cultured in BHI or in SerFA medium containing or not Triclosan (SerFA-Tric). **A**. Bacterial optical density (OD_{600}). In SerFA-Tric, growth resumed after an 8 h latency period compared to non-selective cultures. BHI, black diamonds; SerFA, green squares dashed line; SerFA-Tric, green squares solid line. Growth curves are representative of three independent experiments. **B**. The fatty acid profile of Newman in BHI is shown at left, and that of the SerFA-Tric culture at OD_{600} =1 is at right. Unlike the BHI culture which displays endogenous fatty acids, the SerFA-Tric–grown cells display exclusively eFAs. Black arrow indicates endogenously produced *ai*15. eFAs: 1, C14; 2, C16, 3, C18:1. Bacterial fatty acid profiles are representative of at least ten determinations.

Fig. S1

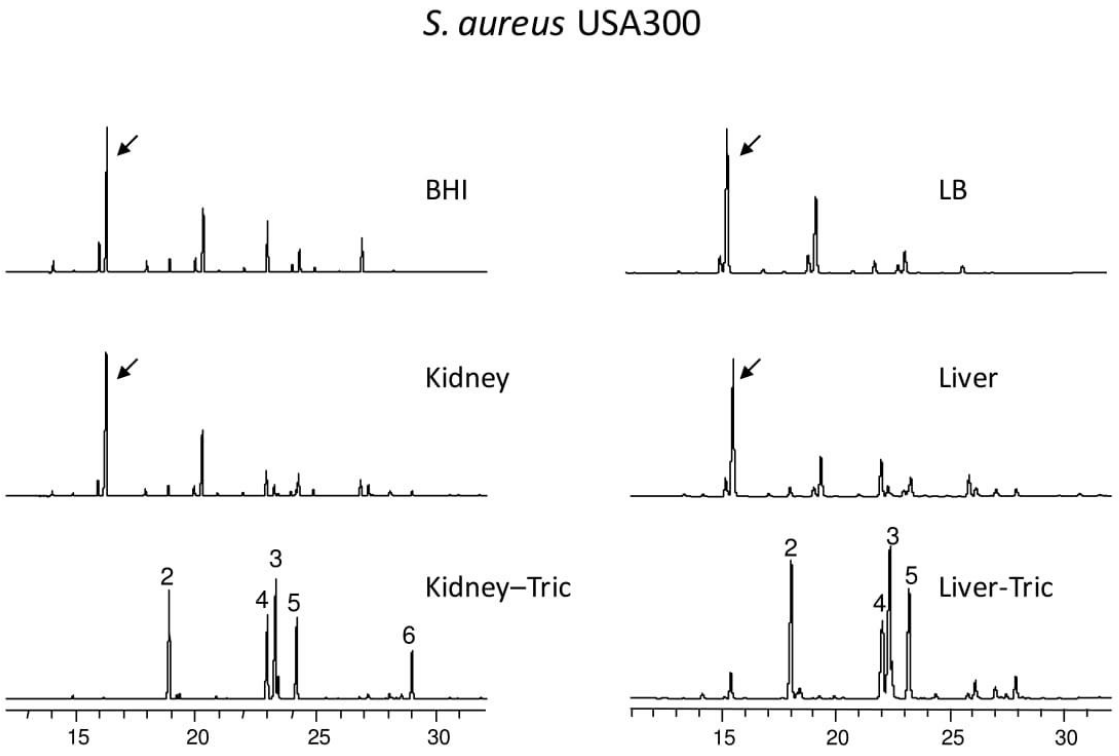


Fig. S2. Fatty acid profiles of *S. aureus* grown in kidney or liver extract and triclosan.
S. aureus USA300 strain was grown overnight in: BHI and LB, and BHI plus 3% pork kidney and LB plus 3% pork liver extracts to which Triclosan (0.5 µg/ml) was added. Organ preparation and extractions for gas chromatography are described (Materials and Methods; see (Morvan et al., 2016) for fatty acid profiles of organs). *S. aureus* endogenous fatty acid *ai*15 is indicated by a black arrow. Organ fatty acids are: 2- C16:0; 3- C18:1; 4- C18:0; 5- C18:2; 6- C20:4. Results are representative of two independent experiments in each condition.

Fig. S2

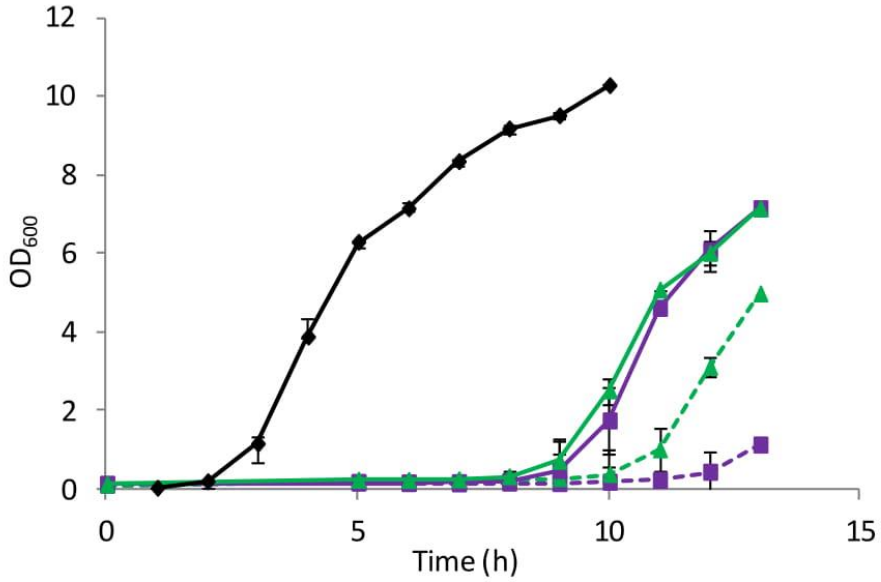


Fig. S3. *S. aureus* pre-exposure to serum-containing medium accelerates adaptation to FASII antibiotics. Bacteria are generally exposed to the host environment including lipids prior to antibiotic treatment. To test the possible impact of *S. aureus* pre-exposure to this environment, USA 300 was cultured in BHI and in SerFA medium. Each culture was then challenged with either triclosan (green lines) or AFN-1252 (purple lines). Growth of antibiotic-challenged cultures without or with preadaptation (respectively dashed and solid lines) was followed by optical density (OD_{600}) for 13 h. Fatty acid profiles taken at 13 h were exogenous (not shown). Average growth curves from three biological replicates are shown. For both FASII antibiotics, pre-exposure of *S. aureus* to SerFA medium accelerates bacterial outgrowth and adaptation.

Fig. S3

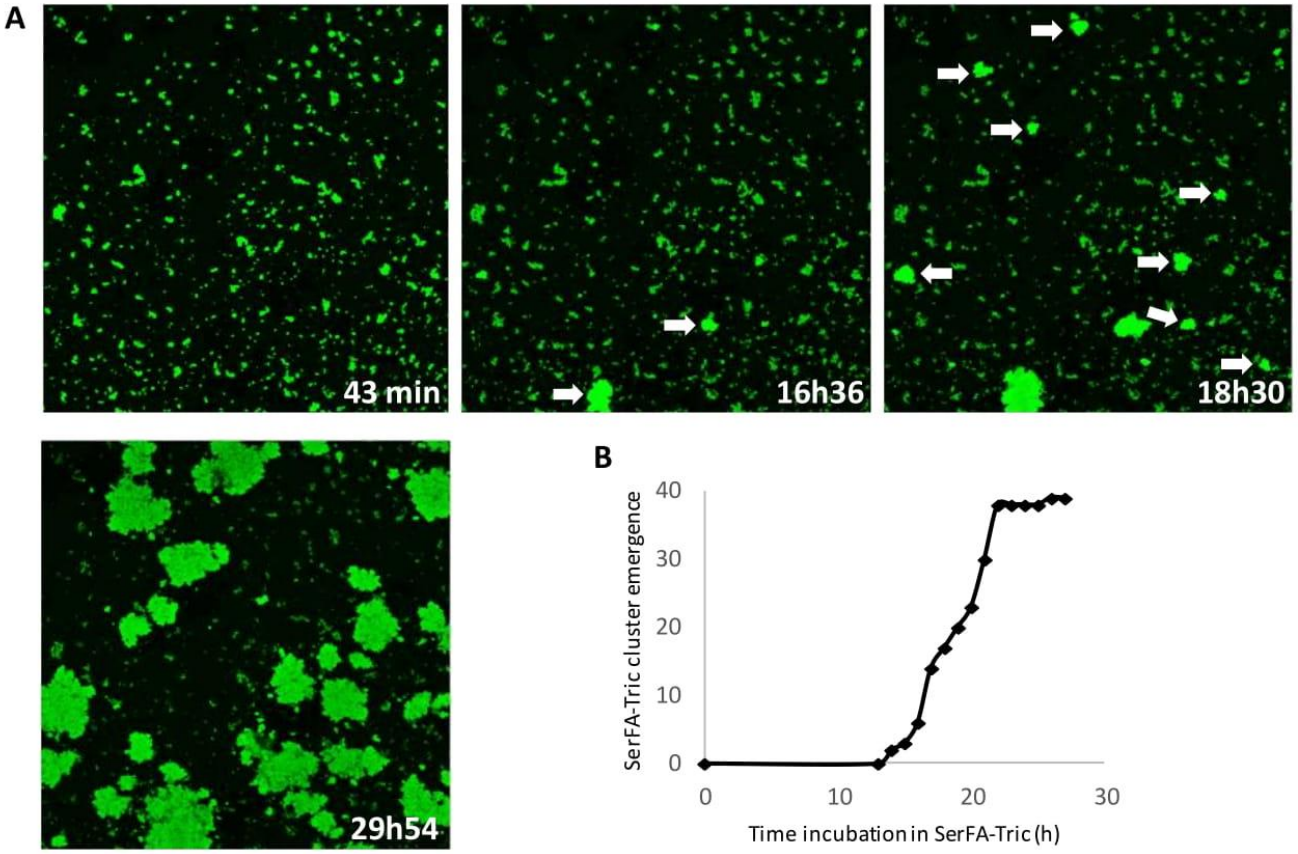


Fig. S4. Kinetics of *S. aureus* adaptation to FASII antibiotic triclosan in biofilm conditions.
Growth of *S. aureus* USA300 in SerFA-Tric was monitored in a time lapse experiment over 60 h; events of the first 30 h are shown. **A.** Still frames from the video (Supplemental data **Movie 2**), were selected at the indicated times to illustrate progression of emerging adapted cells. Triclosan-adapted microcolonies began to appear at around 16 h (white arrows), followed by waves of emerging adapted cell clusters. **B**. The cumulative number of developing triclosan-adapted cell clusters are presented as a function of growth time. In this video, 1424 clusters were counted at the beginning of the experiment. About 2.7% of clusters bloomed over the 30 h period. The surface was nearly confluent by 60 h. Fatty acid profiles of cells recovered at the end of experiments were exogenous, showing that eFA replacement occurred.

Fig. S4

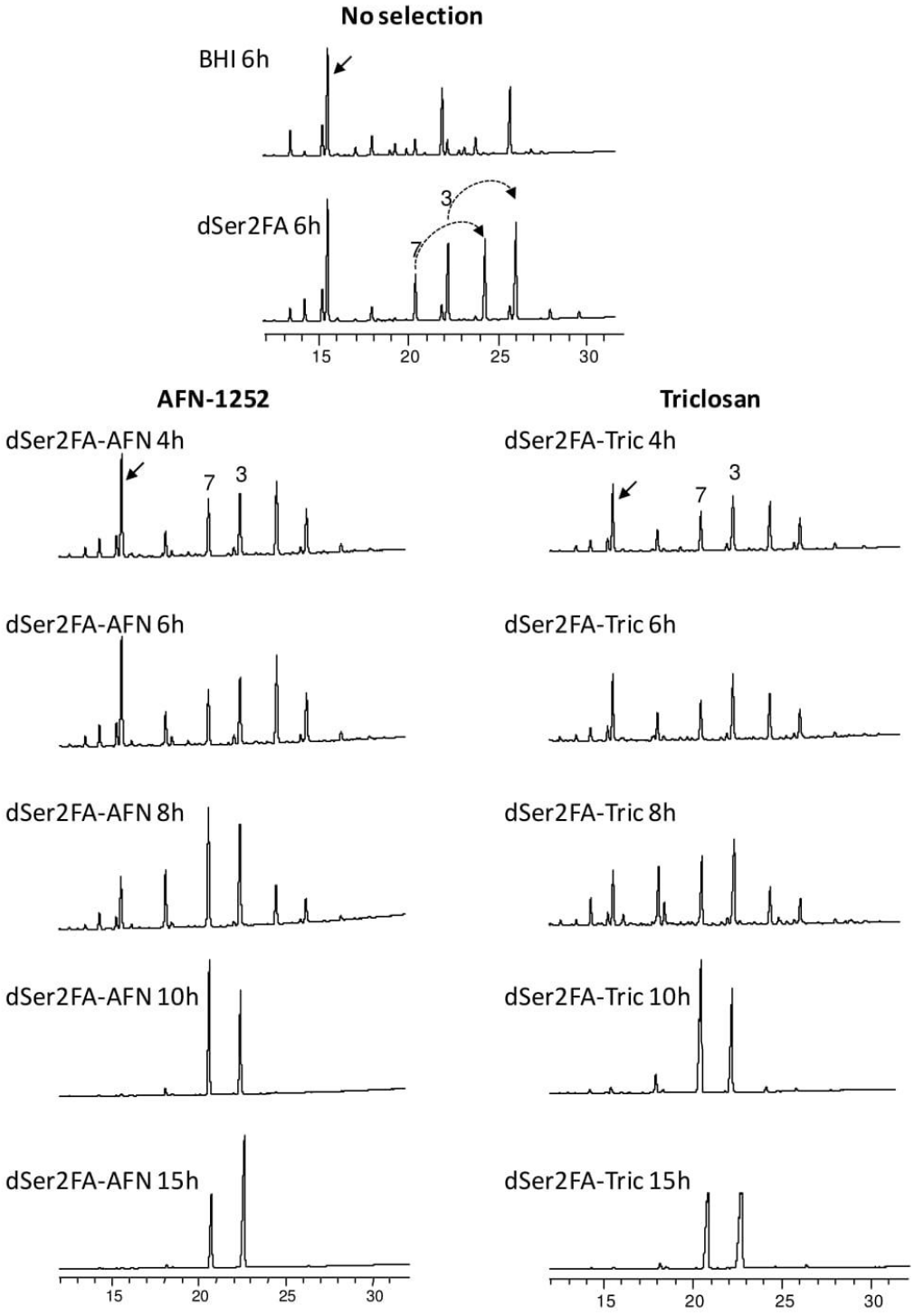


Fig. S5. ***S. aureus*** **USA300 incorporates unsaturated fatty acids 17:1*trans* and 18:1*cis* in non-selective and anti-FASII-selective growth**.

Fatty acid profiles were determined by gas chromatography from cultures grown in dSer2FA (delipidated serum containing 17:1*tr* and 18:1*cis*, neither of which are synthesized by *S. aureus*. AFN-1252 or triclosan was added to the dSerFA preadapted cultures, and fatty acid profiles were analysed at the indicated times. The black arrow indicates endogenously produced *ai*15. eFAs used in experiment: 3, C18:1 (oleic acid *cis*); 7, C17:1 *trans*. Positions of elongation N+2 products are indicated by dashed arrows. The shift in fatty acids, including a clear decrease in *ai*15 pools and increase in eFAs in anti-FASII-containing samples at 10 h is concommitant with growth restart (**Figs. 6** and **S6A**).

Fig. S5

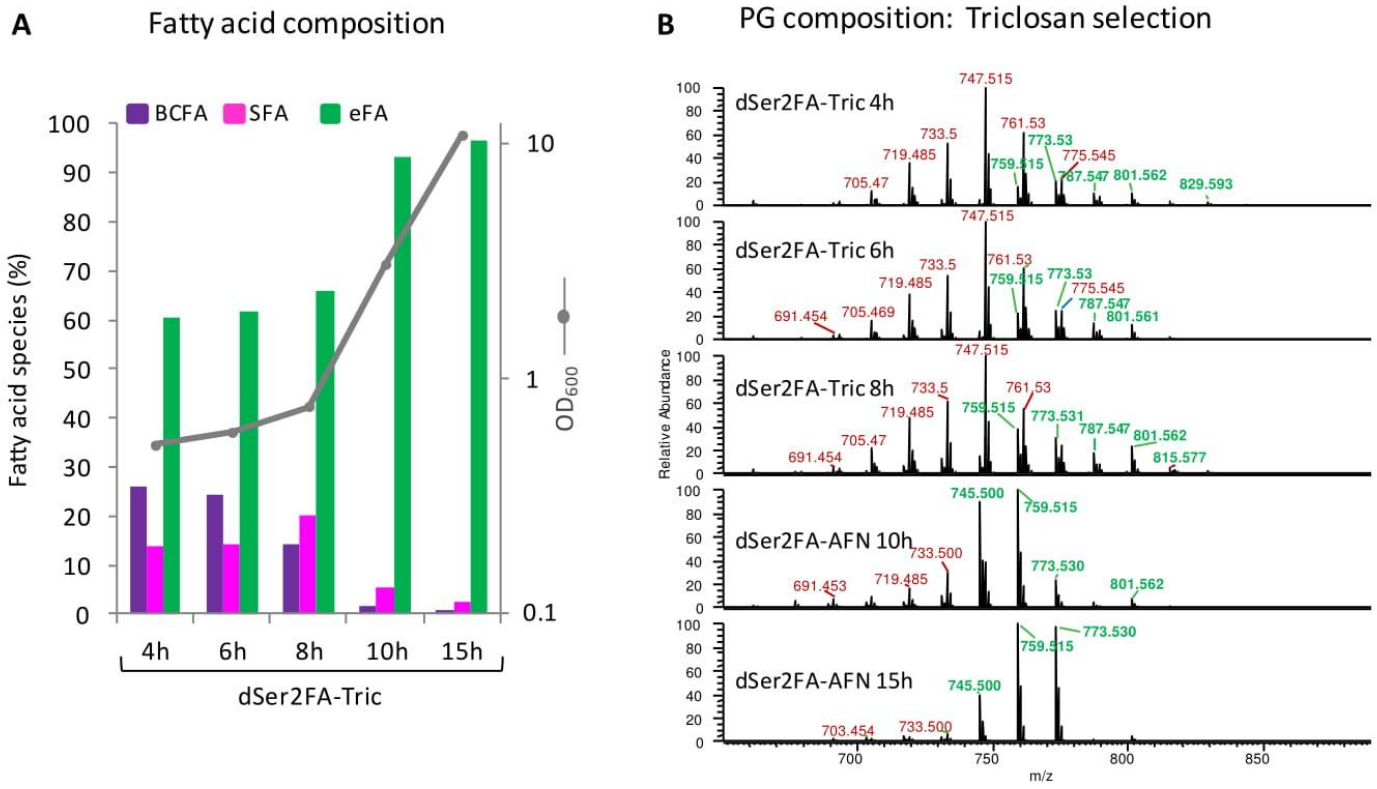


Fig. S6. *S. aureus* kinetics of eFA incorporation and distribution in both phosphatidylglycerol (PG) positions during triclosan selection.

The USA300 strain was preadapted in dSer2FA (BHI with 10% delipidated serum and C17:1*tr* and C18:1*cis*). Triclosan was then added as FASII inhibitor (dSer2FA-Tric; 0.5 µg/ml). Conditions are as described in **Figs. 6** and **7** except that triclosan is used in place of AFN-1252. **A.** Growth and fatty acid composition during triclosan treatment. Cell growth (grey curve) and fatty acid composition are plotted starting 4 h after triclosan addition (initial OD_{600}=0.1). Fatty acid profiles are in **Fig. S5**. Purple, BCFA branched chain fatty acids; pink, SFA saturated (straight chain) fatty acids; green, eFAs. **B.** PG composition modifications during FASII bypass. Samples were analyzed at the indicated times after triclosan addition. In red, PG species with one eFA and one endogenous fatty acid; in green, PG species with eFAs in both positions. Fatty acids comprising main PG species are listed in **Table S4**. Both PG positions are almost exclusively occupied by eFAs starting at 10 h post-triclosan treatment.

Fig. S6

Table S1. SNPs and indels of USA300 and Newman strains after adaptation to growth in anti-FASII in the presence of serum and fatty acids

USA300 SerFA-Tric 1

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	SAUSA 300_#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
	No valid differences														

USA300 SerFA-Tric 2

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	SAUSA 300_#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
460958	gtaata	g	214	34	1.00	Deletion	ggtaataca	ggca	GNT	G	yes	0407	*ssl11*	Exotoxin 15: superantigen-like protein	HIGH

USA300 SerFA-Tric 3

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	SAUSA 300_#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
1295497	A	G	114	27	1.00	Synon	gca	gcG	A	A		1177	*cinA*	ADP-ribose pyrophosphatase COG1058 family / Nicotinamide-nucleotide amidase	LOW
1857276	C	T	42	48	0.81	Synon	ttg	ttA	L	L		1684		Hypothetical	LOW
1961241	G	C	136	46	1.00							1778	*trnaD*	tRNA-Asp-GTC	MODIFIER
1961354	C	T	127	49	1.00							1779	*trnaM*	tRNA-Met-CAT	MODIFIER
270510	T	C	125	42	1.00	Nonsyn	act	Gct	T	A		0226	*fadB*	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	MODERATE
292738	A	C	99	41	1.00	Nonsyn	acg	Ccg	T	P		0242	*gutB*	Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	MODERATE

USA300 SerFA-AFN A

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	SAUSA 300_#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
1295497	A	G	112	16	1.00	Synon	gca	gcG	A	A		1177	*cinA*	ADP-ribose pyrophosphatase COG1058 family / Nicotinamide-nucleotide amidase	LOW
1857276	C	T	86	20	0.83	Synon	ttg	ttA	L	L		1684		Hypothetical	LOW
1961241	G	C	119	22	1.00							1778	*trnaD*	tRNA-Asp-GTC	MODIFIER
1961354	C	T	114	28	1.00							1779	*trnaM*	tRNA-Met-CAT	MODIFIER
1995031	ttttaaaaatagttctttaaattatatacccaccacatttggtggagaacca	t	214	206	1.00	Deletion									MODIFIER
270510	T	C	126	33	1.00	Nonsyn	act	Gct	T	A		0226	*fadB*	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	MODERATE
292738	A	C	133	32	1.00	Nonsyn	acg	Ccg	T	P		0242	*gutB*	Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	MODERATE
556291	T	C	85	16	0.94										MODIFIER

USA300 SerFA-AFN B

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	SAUSA 300_#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
1295497	A	G	71	16	1.00	Synon	gca	gcG	A	A		1177	*cinA*	ADP-ribose pyrophosphatase COG1058 family / Nicotinamide-nucleotide amidase	LOW
1630485	C	A	45	22	0.88	Nonsyn	gaa	Taa	E	*		1476	***accB***	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	HIGH
1857276	C	T	64	27	0.82	Synon	ttg	ttA	L	L		1684		Hypothetical	LOW
1961241	G	C	100	18	1.00							1778	*trnaD*	tRNA-Asp-GTC	MODIFIER
1961354	C	T	99	16	1.00							1779	*trnaM*	tRNA-Met-CAT	MODIFIER
270510	T	C	125	41	1.00	Nonsyn	act	Gct	T	A		0226	*fadB*	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	MODERATE
292738	A	C	118	21	1.00	Nonsyn	acg	Ccg	T	P		0242	*gutB*	Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	MODERATE
556291	T	C	91	12	1.00										MODIFIER

USA300 SerFA-AFN C

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	SAUSA 300_#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
1295497	A	G	99	12	1.00	Synon	gca	gcG	A	A		1177	*cinA*	ADP-ribose pyrophosphatase COG1058 family / Nicotinamide-nucleotide amidase	LOW
1857258	C	T	68	11	0.85	Synon	gag	gaA	E	E		1684		Hypothetical	LOW
1857276	C	T	80	16	0.80	Synon	ttg	ttA	L	L		1684		Hypothetical	LOW
1961241	G	C	113	15	1.00							1778	*trnaD*	tRNA-Asp-GTC	MODIFIER
1961354	C	T	121	14	1.00							1779	*trnaM*	tRNA-Met-CAT	MODIFIER
1997102	A	T	74	11	0.85							1831	*trnaL*	tRNA-Leu-TAA	MODIFIER
270510	T	C	128	18	1.00	Nonsyn	act	Gct	T	A		0226	*fadB*	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	MODERATE
292738	A	C	116	14	1.00	Nonsyn	acg	Ccg	T	P		0242	*gutB*	Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	MODERATE

Newman SerFA-Tric 1

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	NWMN _#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
1578893	A	G	83	10	1.00	Nonsyn	caa	cGa	Q	R		1410	*proC*	Pyrroline-5-carboxylate reductase	MODERATE
1578895	A	C	85	11	1.00	Nonsyn	aac	Cac	N	H		1410	*proC*	Pyrroline-5-carboxylate reductase	MODERATE
897913	G	A	97	15	1.00	Nonsyn	gaa	Aaa	E	K		RS0458 5		Pseudo	MODERATE
897914	A	G	100	17	1.00	Nonsyn	gaa	gGa	E	G		RS0458 5		Pseudo	MODERATE

Newman SerFA-Tric 2

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	NWMN _#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
1578874	A	T	32	12	1.00	Nonsyn	ata	Tta	I	L		1410	*proC*	Pyrroline-5-carboxylate reductase	MODERATE
1578893	A	G	135	77	1.00	Nonsyn	caa	cGa	Q	R		1410	*proC*	Pyrroline-5-carboxylate reductase	MODERATE
1578895	A	C	131	76	1.00	Nonsyn	aac	Cac	N	H		1410	*proC*	Pyrroline-5-carboxylate reductase	MODERATE
897892	A	T	114	88	1.00	Nonsyn	aaa	Taa	K	*		RS0458 5		Pseudo	HIGH
897913	G	A	132	113	1.00	Nonsyn	gaa	Aaa	E	K		RS0458 5		Pseudo	MODERATE
897914	A	G	134	117	1.00	Nonsyn	gaa	gGa	E	G		RS0458 5		Pseudo	MODERATE

Newman SerFA-Tric 3

Pos	Ref	Var	Score	Var_ cov	Var_ frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frame-shift	NWMN _#	Gene_ name	Function	snpEff_impact
1578893	A	G	85	11	1.00	Nonsyn	caa	cGa	Q	R		1410	*proC*	Pyrroline-5-carboxylate reductase	MODERATE
1578895	A	C	85	11	1.00	Nonsyn	aac	Cac	N	H		1410	*proC*	Pyrroline-5-carboxylate reductase	MODERATE
897892	A	T	81	12	1.00	Nonsyn	aaa	Taa	K	*		RS0458 5		Pseudo	HIGH
897913	G	A	101	17	1.00	Nonsyn	gaa	Aaa	E	K		RS0458 5		Pseudo	MODERATE
897914	A	G	100	17	1.00	Nonsyn	gaa	gGa	E	G		RS0458 5		Pseudo	MODERATE

Analyses were performed using Patricbrc.org (Wattam *et al*, 2017)
Pink: Insertion mutants of indicated genes from Nebraska library collection were tested in SerFA-Tric medium and grew with similar kinetics as parental USA300 strain. Drift in these genes was previously reported.
Yellow: *acc* mutations were shown previously to lead to FASII bypass

Supplementary Tables

Table S2. *S. aureus* USA300 fatty acid composition according to major PG species in BHI and dSerFA 6h cultures.

BHI 6h culture

m/z	PG	FA composition
679.453	29:0	**14:0-15:0**
693.469	31:0	**15:0-15:0**
707.483	31:0	**16:0-15:0**
721.5	32:0	**17:0-15:0** 14:0-18:0
735.515	33:0	**15:0-18:0**
749.530	34:0	**15:0-19:0**
763.545	35:0	**15:0-20:0**
777.56	36:0	**15:0-21:0**
791.575	37:0	17:0-20:0 **15:0-22:0**

dSerFA 6h culture

m/z	PG	FA Composition
691.454	30:1	**13:0-17:1**
705.47	31:1	**13:0-18:1** 14:0-17:1
719.485	32:1	14:0-18:1 **15:0-17:1**
733.500	33:1	**15:0-18:1**
747.517	34:1	**15:0-19:1**
761.53	35:1	**15:0-20:1**
773.530	36:2	**18:1-18:1**
775.544	36:1	**15:0-21:1** 18:0-18:1
787.547	37:2	**17:1-20:1** 19:1-18:1
801.562	38:2	**18:1-20:1**
815.577	39:2	**19:1-20:1**
829.593	40:2	**20:1-20:1**

Lines in green, fully exogenous species; in pink, mixed endogenous/exogenous species; in white fully endogenous species. When 2 fatty acid constituents were identified for one mass, the minor species are in light print. In SerFA series: Note that all main PG species comprise at least one eFA.

Table S3. Fatty acid composition of PG becomes fully exogenous during *S. aureus* JE2 treatment with anti-FASII AFN-1252 in medium containing 17:1*tr* and C18:1*cis* in delipidated serum.

			Time after AFN-1252 addition				
m/z	PG	Fatty acid composition	4h	6h	8h	10h	15h
691.454	30:1	13:0-17:1	++	*	++	-	-
		12:0-18:1	--		++	++	++
693.469	30:0	16:0-14:0	++	++	++	*	
		15:0-15:0	++	++	+		
705.47	31:1	14:0-17:1	++	++	++	++	
717.469	32:2	14:1-18:1					++
719.485	32:1	14:0-18:1	++	++	++	++	++
		17:1-15:0	++	++	++	++	+
733.500	33:1	14:0-19:1	++	++	++	-	--
		15:0-18:1	++	++	++	+	+
		16:0-17:1	-	-	++	++	++
745.500	34:2	17:1-17:1	*	*	++	++	++
747.517	34:1	15:0-19:1	++	++	++		
759.515	35:2	17:1-18:1	*	*	++	++	++
761.530	35:1	15:0-20:1	++	++	++		
773.531	36:2	17:1-19:1	++	++	+		
		18:1-18:1	++	++	++	++	++
775.544	36:1	15:0-21:1	++	++			
		18:0-18:1	+	+		++	++
787.547	37:2	17:1-20:1	++	++	++		
		19:1-18:1	++	+	++		
789.561	37:1	15:0-22:1	++	++	*		
		17:0-20:1	++	++			
801.562	38:2	18:1-20:1	++	++	++		
815.577	39:2	19:1-20:1	++	++	++		
817.558	39:1	18:1-21:0	++	++	++		
829.593	40:2	20:1-20:1	++	++	++		

Lines in green, fully exogenous species; in pink, mixed endogenous/exogenous species; in white fully endogenous species. Note that all major species contain at least one eFA throughout.

n SerFA series: *, no available MS2 profile. In green, fully exogenous species.

++ Intensity>50%; +, 20%<Intensity<50%; -, 5%<I<20%; --, I<5%. *, *, no MS2 available. When 2 fatty acid constituents were identified for one mass, the minor species are in light print. In red '++', dominant PG species.

Table S4. Fatty acid composition of PG becomes fully exogenous during *S. aureus* JE2 treatment with anti-FASII triclosan in medium containing 17:1*tr* and C18:1*cis* in delipidated serum.

			Time after triclosan addition				
m-z	PG	Fatty acid composition	4h	6h	8h	10h	15h
691.454	30:1	13:0-17:1	++	++	++	++	-
		12:0-18:1	-	-	+	++	++
693.469	30:0	16:0-14:0	++	++	++		
		15:0-15:0	++	++	++		
		13:0-17:0	-	+	++		
703.454	31:2	13:1-18:1				++	++
705.47	31:1	13:0-18:1	+	++	++	++	
		14:0-17:1	++	++	++	++	
717.469	32:2	14:1-18:1			+		++
		17:1-15:1			++		-
719.485	32:1	14:0-18:1	++	++	++	++	++
		17:1-15:0	++	++	++	++	+
731.484	33:2	15:1-18:1		++	++	++	++
		17:1-16:1		-	-	++	++
733.5	33:1	14:0-19:1	+	++	+	+	--
		15:0-18:1	++	++	++	++	++
		16:0-17:1	-	+	+	++	++
745.500	34:2	17:1-17:1	*	++	++	++	++
747.517	34:1	15:0-19:1	++	++	++	+	
		17:0-17:1	--	--	-	++	
759.515	35:2	17:1-18:1	++	++	++	++	++
761.530	35:1	15:0-20:1	++	++	++		
773.531	36:2	18:1-18:1	++	++	++	++	++
775.544	36:1	15:0-21:1	++	++	++		
		18:0-18:1	++	++	++		
787.547	37:2	17:1-20:1	++	++	++	++	
		19:1-18:1	++	++	+	++	
801.562	38:2	18:1-20:1	++	++	++	++	++
815.577	39:2	18:1-21:1	+	++	++		
		19:1-20:1	++	++	++		
829.593	40:2	20:1-20:1	++	++	++		

Major PG species in bold; *, no available MS2 profile. In green, fully exogenous species.
++ Intensity>50%; +, 20%<Intensity<50%; -, 5%<I<20%; --, I<5%. *, *, no MS2 available. When 2 fatty acid constituents were identified for one mass, the minor species are in light print. In red '++', dominant PG species.

III) Détermination des voies mises en œuvre pour l'utilisation des acides gras exogènes sans mutation de la voie FASII

1) Article N°3 : manuscrit en préparation

Ce papier devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeux par *S. aureus* dans l'adaptation aux anti-FASII (mécanisme décrit dans l'article n°2). Pour cela, nous avons entrepris de faire un screening d'une banque de 2000 mutants afin de connaître les gènes liés à cette adaptation. En parallèle, nous avons réalisé une étude protéomique afin de visualiser les voies mises en jeu.

Article N°3 : Caractérisation des facteurs impliqués dans l'adaptation de *S. aureus* aux antibiotiques anti-FASII.

Gérald Kénanian, Amit Pathania, Jamila Anba et Alexandra Gruss

Staphylococcus aureus est l'un des pathogènes qui touche le plus de personnes de nos jours. Il fait partie de la liste des 10 pathogènes les plus importants d'après le CDC, et cette bactérie fait l'objet d'un suivi international de l'évolution planétaire des résistances aux antibiotiques (101). Pour le contrer, il a été proposé d'inhiber la production des acides gras essentiels à la formation de sa membrane plasmique. Les anti-FASII, inhibiteurs de cette voie de synthèse des acides gras ont été présentés comme une bonne alternative permettant d'éliminer cette bactérie (205).Il a en revanche été démontré que *S. aureus* pouvait contourner cette inhibition en utilisant les acides gras exogènes présents dans l'environnement comme dans le sérum (article N°2). *S. aureus* peut ainsi s'adapter soit par mutation des gènes d'initiation de FASII en mutant un gène à haute fréquence (115) appelé *fabD* (article N°1), soit par un phénomène d'adaptation sans mutation décelable (article N°2).

Nous savons maintenant que les acides gras exogènes peuvent être retrouvés dans les 2 positions des phospholipides, et que la population qui s'adapte représenterait environ 3% de la population bactérienne dans nos conditions. Cette population est caractérisée par un temps d'adaptation allant de 6 à 10 heures qui pourrait être lié à un problème de division cellulaire. Notre objectif est d'identifier les voies et les gènes impliqués dans cette adaptation. Notre but est de déterminer le mécanisme de contournement de l'inhibition de la voie FASII. Enfin, ces informations seront utilisées afin de proposer, si possible, une bithérapie alliant les anti-FASII et un inhibiteur de la voie de contournement.

Pour répondre à cette question, une étude protéomique durant le temps d'adaptation à ces acides gras exogènes a été entreprise ainsi que la réalisation d'un screening d'une banque de 2000 mutants SAUSA300 (233,234). Ces deux approches nous ont permis d'identifier plusieurs facteurs impliqués dans l'adaptation de *S. aureus* à des anti-FASII, de mieux comprendre les gènes et donc les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène.

Résultats

Le screening de la banque de mutants

Le screening de la banque de mutants NARSA a été entrepris afin d'identifier les gènes essentiels à l'adaptation de *S. aureus* aux acides gras exogènes. Cette banque a été créée par insertion de transposon portant un gène de résistance à l'erythromycine (233). Notre screening s'est déroulé sur les milieux décrits dans (137) et l'article N°2 : il comprend le BHI, des acides gras exogènes (C14 :0, C16 :0 et le C18 :1) et le sérum (facilite la prise de ces acides gras exogènes), sans ou avec l'anti-FASII triclosan (SerFA ou SerFA-Tric). Ce screening s'est déroulé en deux étapes. La première a été réalisée sur milieux solides, BHI et SerFA-Tric (Fig. 1). Nous avons repiqué l'ensemble des clones de la banque sur ces deux milieux (SerFA-Tric en tripicata). Les isolats qui se sont

développés en BHI mais pas en SerFA-Tric ont été sélectionnés. Cette première étape a permis de faire ressortir 62 candidats potentiellement défectueux pour l'adaptation aux anti-FASII.

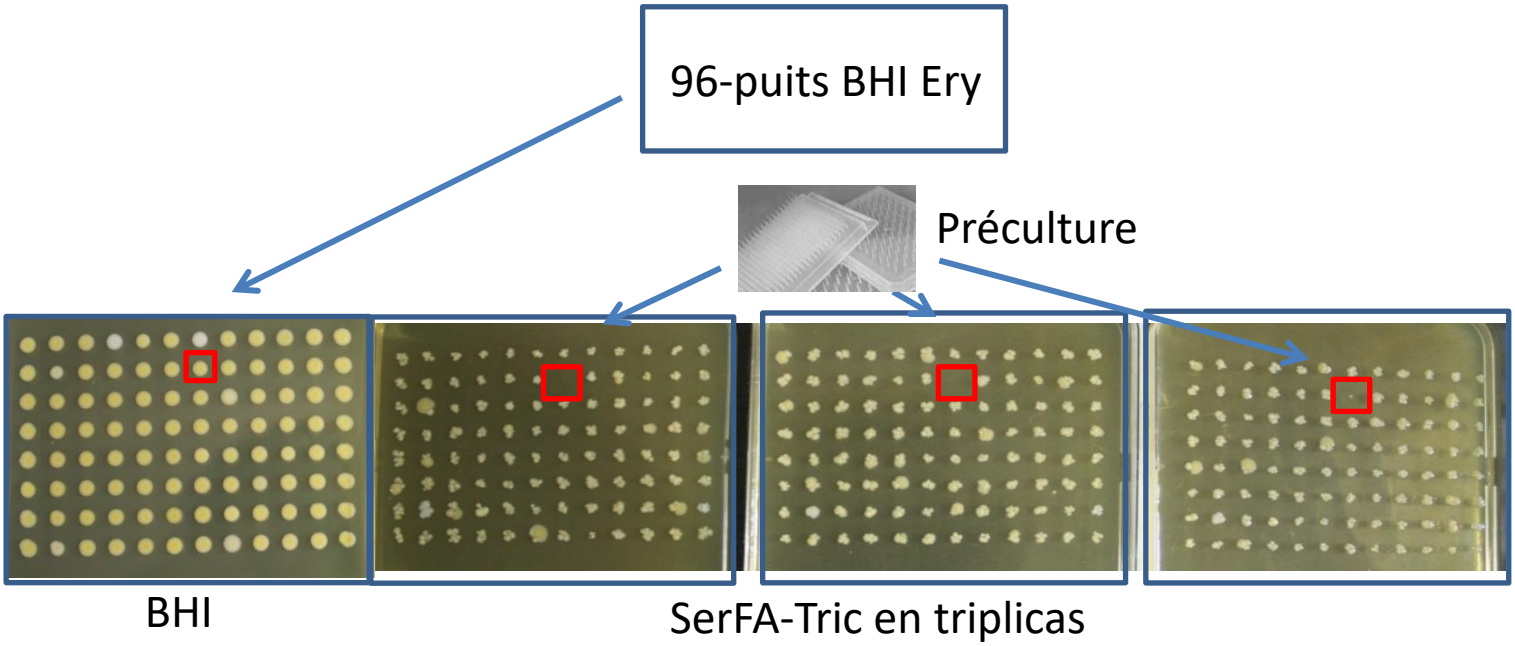


Fig. 1 : ***Ce schéma représente le screening à « haut débit » sur boîte agar BHI et SerFA-Tric.*** *Après une préculture en plaque 96 puits en BHI supplémenté en érythromycine, une brosse en plastique a été utilisée pour déposer une goutte sur des boîtes BHI et SerFA-Tric agar.*

Ce criblage n'a pas permis de distinguer des mutants ayant une meilleure croissance ; cependant, certains mutants préselectrionnés et testés en culture liquide ont donnés de tels phénotypes (voir ci-dessous). Par ailleurs, nous avons remarqué, lors de ce criblage, des mutants ayant une pigmentation différente (par exemple le mutant SAUSA300_2498, *crtN* codant pour une squalene synthase), une mauvaise croissance en BHI (le mutant SAUSA300_1397 codant pour une enzyme phagique), et des morphologies différentes de certains mutants comparés à la souche parentale (SAUSA300_1615 codant pour *hemB* qui est une Δ-aminolevulinic acid déshydratase).

Une deuxième étape du screening, a été effectuée en condition liquide avec les mutants sélectionnés ou ressortis du screening sur boîte (Fig. 2). Cette fois, nous avons comparé la croissance en SerFA et SerFA-Tric. Notre objectif dans cette vérification était de confirmer que l'absence de croissance en SerFA-Tric n'est pas dû au cocktail acides gras/sérum dans le milieu.

Nous avons utilisé les mutants de la « fatty acid kinase » (*fakA*, *fakB1*, *fakB2*) comme contrôle lors de ce screening. Comme discuté dans l'introduction (115), ces gènes sont essentiels pour la prise des acides gras exogènes. L'absence de croissance de ces mutants en condition SerFA-Tric valide l'utilité de cette méthologie.

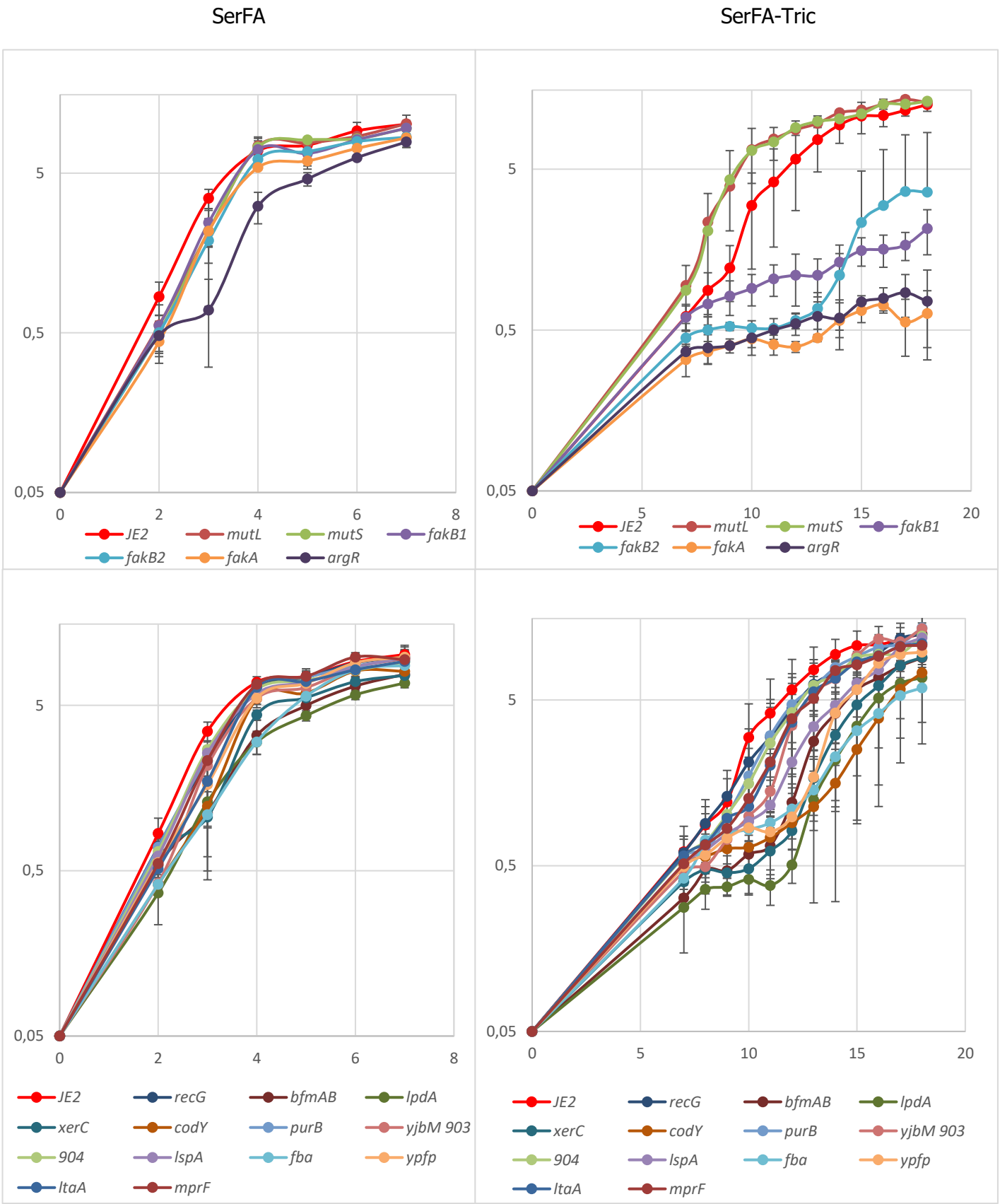


Fig. 2 : ***Courbes de croissance des 19 mutants en SerFA et en SerFA-Tric.*** *Sur la partie haute les mutants ayant un phénotype le plus marqué (en avance ou ne s'adaptant pas) sont présentés. Ces mutants font partie d'un groupe préalablement reçu de la collection et criblé séparément. Dans la partie basse les mutants ont un phénotype moins marqué, avec un retard d'adaptation par rapport à la souche WT JE2 en rouge.*

Ce screening a permis de faire ressortir 19 mutants regroupés en 3 types de phénotypes (Tab. 1): les mutants ayant une adaptation **plus rapide** que le WT (ces mutants font partie d'un groupe préalablement reçu de la collection et criblé séparément), ceux ayant **un retard d'adaptation** et enfin ceux **ne pouvant pas s'adapter**.

Gènes mutés		Temps d'adaptation en présence d'anti-FASII	Fonctions	
SAUSA300	Nom gène			
1188	*mutS*	2h	Système de réparation de l'ADN	ADN
1189	*mutL*	2h		
1120	*recG*	3h (puis comme le WT)	Métabolisme de l'ADN	
1145	*xerC*	3h	Résolution de dimère de chromosome	
1889	*purB*	3h (puis 1h)	Synthèse purine	
733	*fakB1*	Pas d'adaptation	Métabolisme des lipides exogènes	Lipides/Membrane
1318	*fakB2*	Pas d'adaptation		
1119	*fakA*	Pas d'adaptation		
1465	*bfmAB*	2h	Acides aminés → Acides gras	
1467	*lpdA*	Pas d'adaptation (puis 3h)		
1469	*argR*	Pas d'adaptation		
1089	*lspA*	2h	Biosynthèse lipoprotéines	
1255	*mprF*	1h30	Modification lipide	
0918	*ypfP*	2h	Synthèse LTA	
0917	*ltaA*	2h30		
1148	*codY*	2h	Régulateur	Réponse stringente
903	*yjbH*	1h30	Adaptateur ClpXP Modification post traductionnelle	Oxydo-réduction
904	*trsHb*	2h (puis sans retard)	Hémoglobine tronquée de Bacillus Subtilis : Stockage oxygène	
2079	*fba*	3h	Métabolisme du sucre	Glycolyse

Tab. 1 : ***Tableau résumant la liste des 19 mutants regroupés en 3 catégories.*** *En vert les mutants ayant une adaptation plus rapide à la prise des acides gras exogènes, en orange les mutants ayant un retard de croissance, et en rouge ceux qui n'ont pas pu s'adapter. En* ***noir*** *les mutants ayant eu des résultats non-reproductibles. Ces résultats seront discutés par la suite.*

Vérification des mutants

- Profils exogènes des acides gras membranaires

Les profils en acides gras des mutants ont été analysés afin de confirmer qu'en fin de croissance, même si très faibles, les mutants ont incorporé ou non des acides gras exogènes. Pour la plupart des mutants, les profils sont exogènes, ce qui indique que l'anti FASII est actif et qu'il y a utilisation des acides gras exogènes. Les mutants *fak* et *lpdA* ont donnés des profils endogènes avec une faible croissance. Le mutant *ypfP* a donné un profil mixte et majoritairement endogène.

- Intégrité du gène *fabD*

Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de mutations dans le gène *fabD* préférentiellement muté dans un milieu contenant des acides gras (article n°1).

- Vérification de la présence du transposon dans le gène muté

Une vérification de la présence du transposon a été effectuée pour les 19 mutants ressortis de ce screening afin de vérifier que les gènes soient bien mutés.

Rôle des mutants

- Absence d'adaptation aux anti-FASII : ***fakA***, ***fakB1***, ***fakB2***.

Les rôles des gènes *fakA*, *fakB1* et *fakB2* ont été récemment découverts (125,136). Ces gènes sont nécessaires pour la première étape d'incorporation des acides gras exogènes en les phosphorylant (il est à noter que la voie *fad* pourrait incorporer des acides gras en produisant acyl-CoA, ce qui les envoient vers la dégradation par β-oxydation (151)) (Fig. 3).

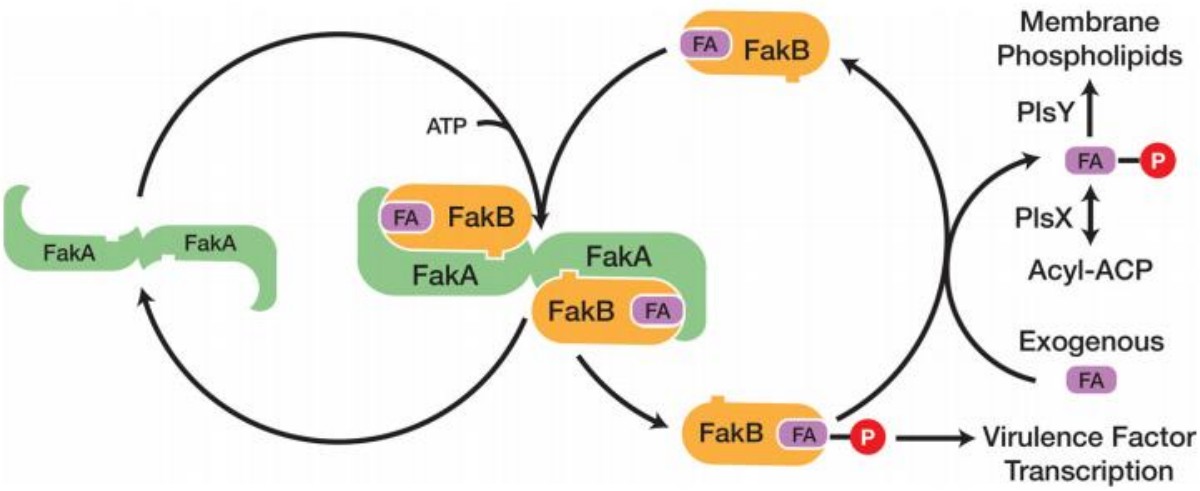


Fig. 3 : ***Les gènes fak sont essentiels à la prise des acides gras exogènes (235).*** *Ce système à deux composants est composé de FakA/FakB1 pour la phosphorylation des acides gras saturés et FakA/FakB2 pour les acides gras insaturés.*

- Les mutants liés à l'ADN

Parmi les mutants liés à l'ADN, ***mutS*** et ***mutL*** ont une adaptation **plus rapide** que la souche WT de deux heures environ (voir Tab. 1). Une fonction de ces gènes est d'empêcher et de réparer les mésappariements de l'ADN, dûs, par exemple aux glissements de la polymérase de l'ADN lors de la réplication (236) (Fig. 4).

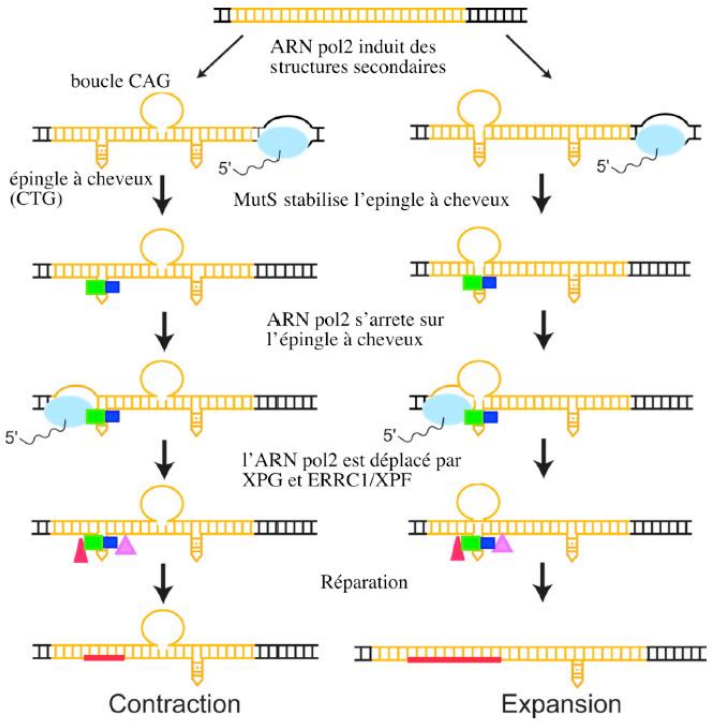


Fig. 4 : ***Schéma représentant la fonction des gènes mutS et mutL****. Ces gènes sont représentés par les carrés bleu et vert. En plus d'éviter les mutations ponctuelles, ces gènes pourraient être responsables de contraction ou d'expansion du chromosome due aux épingles à cheveux créés par l'ARN polymérase 2. La stabilisation de l'épingle à cheveux par mut va bloquer l'ARN polymérase 2 et déclencher le système NER qui va initier la réparation et permettre de raccourcir ou d'allonger le brin réparé* (237).

Une hypothèse pour expliquer une adaptation plus rapide chez ces mutants est par l'apparition d'une mutation ou d'un réarrangement qui pourrait être responsable d'un mécanisme de contournement de la voie FASII. Afin de vérifier si la mutation de ces gènes jouerait un rôle dans l'adaptation, nous avons séquencé les génomes suivants :

Souches séquencées	Conditions
MutS	BHI
	SerFA
	SerFA-Tric (x4)
JE2 (WT)	BHI
	SerFA

Aucune mutation n'a pu être trouvée dans les gènes de FASII comme décrit dans la publication N°2 ni aucune mutation commune par ailleurs (données disponibles en annexe). Une hypothèse alternative concerne de possibles réarrangements non visibles par notre protocole de séquençage génomique, qui ne les discerne pas (séquences trop courtes). Pour discerner des remaniements, il faudrait utiliser d'autres méthodologies (gels de champs pulsés, séquençage par technologie « Pacbio »).

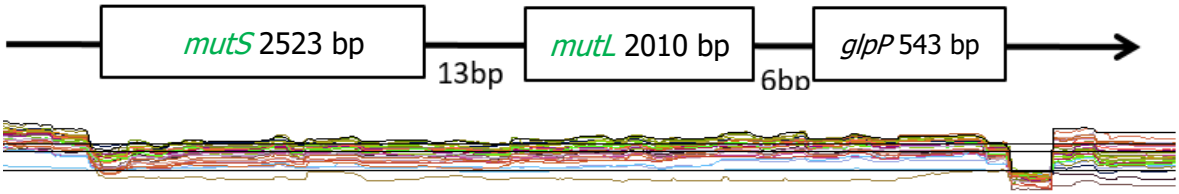


Fig. 5 : ***Contexte génomique des gènes mutS et mutL.***

Afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'effet polaire des gènes *mut* sur le gène en aval, *glpP*, nous avons testé les effets d'un mutant *glpP* (gène en aval) sur l'adaptation (Fig. 5). *GlpP* code pour un régulateur de l'opéron *glpD* permettant l'utilisation du glycérol (composant des phospholipides). Cependant, le mutant ne s'est pas distingué de la souche sauvage, ce qui laisse à penser que les effets sur l'adaptation aux anti-FASII observés chez les mutants *mut* sont bien liés à ces gènes et sont indépendants de *glpP*.

Un test de complémentation par des gènes *mutSL* permettrait à confirmer que les effets observés sont dûs à leurs activités.

- ***xerC*** et ***codY***

Des mutants des gènes d'un même opéron (Fig. 6), *xerC* et *codY,* sont ressortis du screening. Un effet polaire de *xerC* sur *codY* semble improbable, car le mutant dans un gène intermédiaire 1147 ne montre pas de phénotype différent de la souche WT en SerFA-Tric. Par ailleurs, deux publications montrent que la mutation de *xerC* n'aurait pas d'effet polaire sur *codY* (prouvé par complémentation de CodY sur plasmide) (238,239).

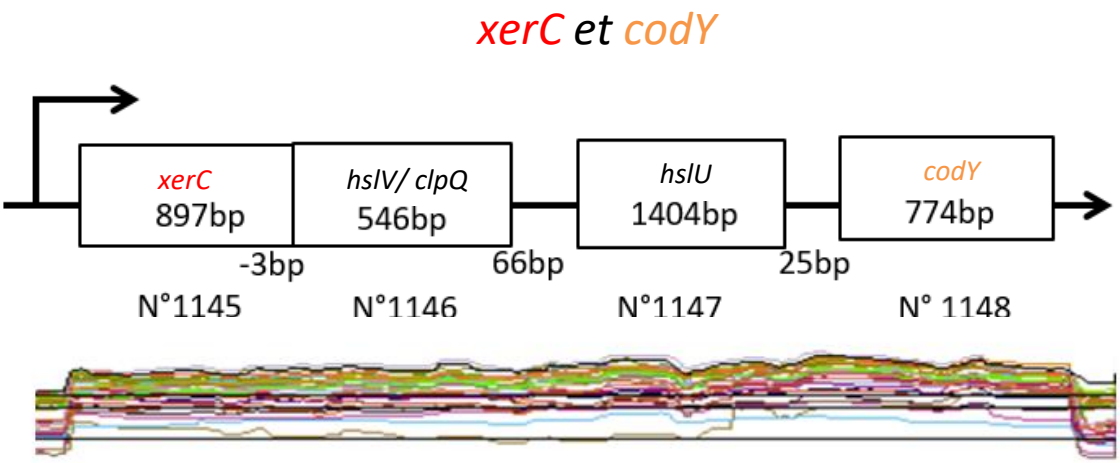


Fig. 6 : ***Les gènes xerC et codY sont co-transcrits (240,241).*** *Cependant une mutation dans xerC n'aurait pas d'effet polaire sur codY.*

XerC fait partie d'un complexe XerC-XerD qui permet de convertir les dimères des chromosomes bactériens en monomères permettant ainsi la ségrégation de l'ADN des cellules en divisions (242), malgré son rôle le mutant est viable (Fig. 7). Nous avons observé précédemment par microscopie à fluorescence (article n°2) et en microscopie électronique (annexe) que de manière globale, les cellules sont stressées en SerFA-Tric, et qu'une majorité est bloquée en division cellulaire. L'observation que l'adaptation à l'anti-FASII soit retardée dans le mutant *xerC* est compatible avec l'hypothèse que les bactéries sont bloquées à ce stade. Nous allons voir plus tard qu'une seule fonction de la machinerie de réplication, FtsK, est affectée en SerFA-Tric. Les fonctions du gène *XerC* sont liées à la protéine FtsK.

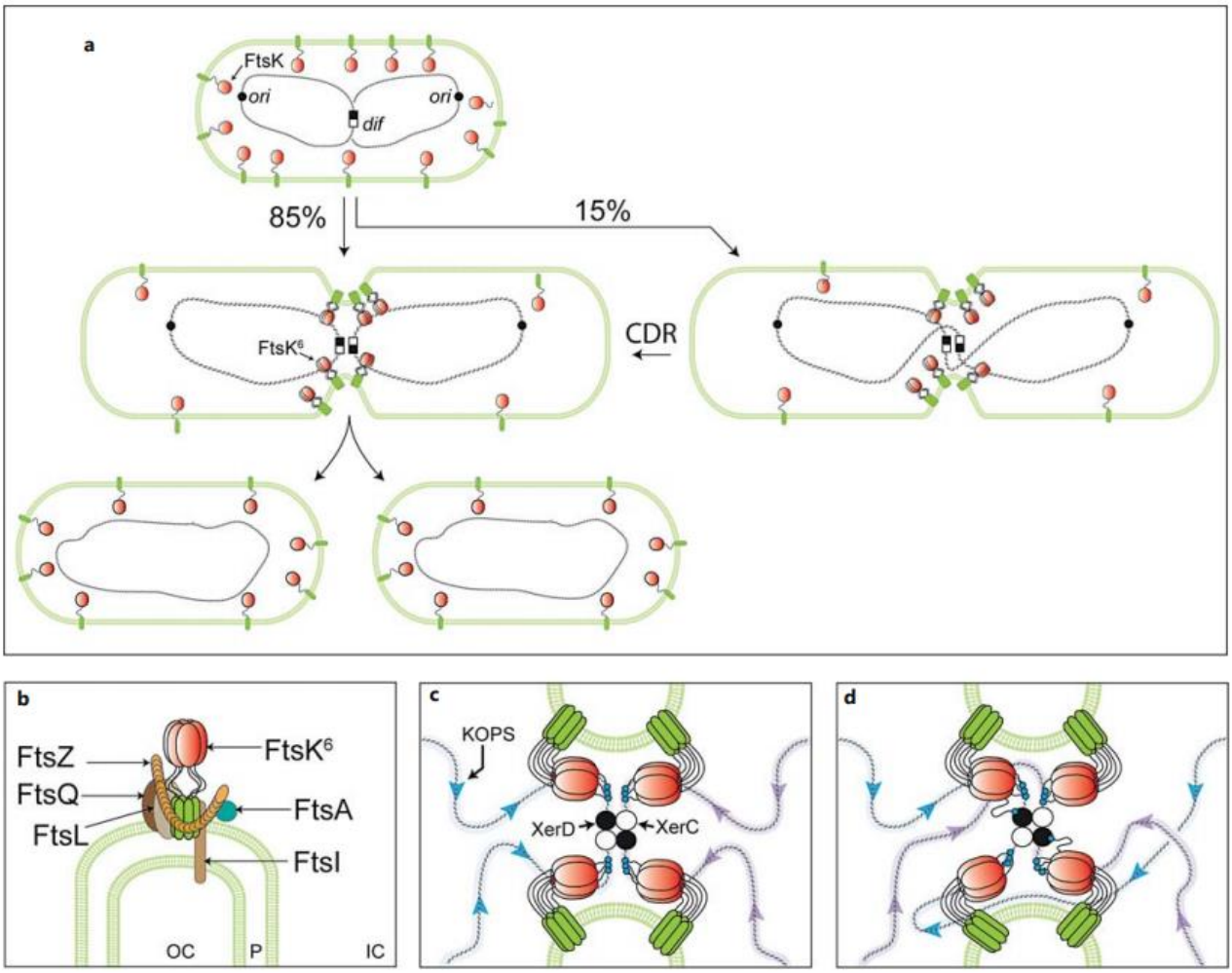


Fig. 7 : ***Schéma représentant les mécanismes mis en jeu pour la ségrégation de l'ADN et le rôle de XerC (242).*** *Chez E. coli, il y a formation d'un hexamère (FtsK) localisé au niveau du septum. 15% des cellules forment des dimères chromosomiques qui seront résolu par XerCD. OC=outer cell ; P=periplasm ; IC=inner cell. FtsK-N est en vert, FtsK-C est en rouge et FtsKy en bleu. Le domaine FtsKy active XerD et la reconnaissance KOPS (séquence d'ADN de 8pb).*

La dimérisation de l'ADN nécessite des protéines ancrées dans la membrane. Il est possible d'imaginer qu'un changement dans la fluidité membranaire pourrait modifier l'activité de FtsK et le complexe XerCD. Une complémentation du gène XerC est en cours, afin de confirmer qu'il n'y aurait pas d'effet polaire entre XerC et CodY. De manière intéressante XerC serait sous exprimé lors de la réponse stringente chez *S. aureus* (243). Comme discuté plus tard ce mutant n'est pas le seul à être lié à la réponse stringente, réponse qui semble avoir son importance dans ce phénomène d'adaptation.

- Métabolisme des acides gras ramifiés

Un autre locus semble indispensable à l'adaptation, comprenant un régulateur, ***argR*** et des gènes *bfmAB*, *bkdA1*, *bkdB*, *lpdA* et *recN* (Fig. 8). Les 4 gènes (sauf *recN*) codent pour des gènes d'un complexe BKD. *recN* code pour une protéine responsable de la réparation de l'ADN par recombinaison.

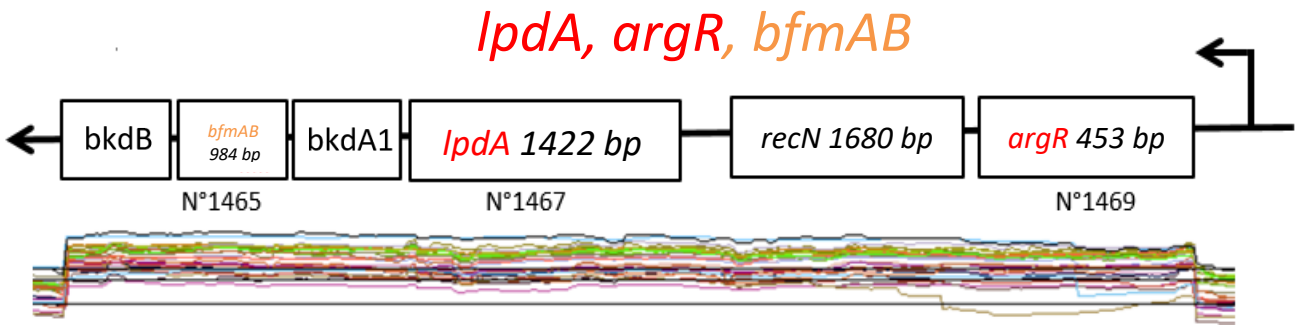


Fig. 8 : ***Les gènes argR, lpdA et bfmAB (ou appelé bkdA2) sont codés sur le même opéron (241).*** *L'opéron Pdh est similaire à celui de Bkd, il est composé de 2 gènes pdh à la suite et d'un gène lpdA (244).*

Le gène ***lpdA*** est responsable de la synthèse des acides gras branchés à partir des acides aminés branchés. Cette synthèse est possible grâce au complexe BKD dont LpdA est une sous unité. Un autre complexe joue le même rôle chez *S. aureus* : il est appelé PDH (245). Les acides gras branchés représentent environ 50% des acides gras de la membrane, cette proportion est variable selon les conditions de croissance (166). Un mutant délété du complexe BKD serait responsable d'une synthèse réduite des acides gras branchés et d'une baisse de la fluidité membranaire (Fig. 9). Dans ce cas cette souche est aussi plus susceptible à la daptomycine (245). La similarité entre les voies BKD et PDH pourraient expliquer une compensation fonctionnelle (ce qui n'est pas encore prouvé).

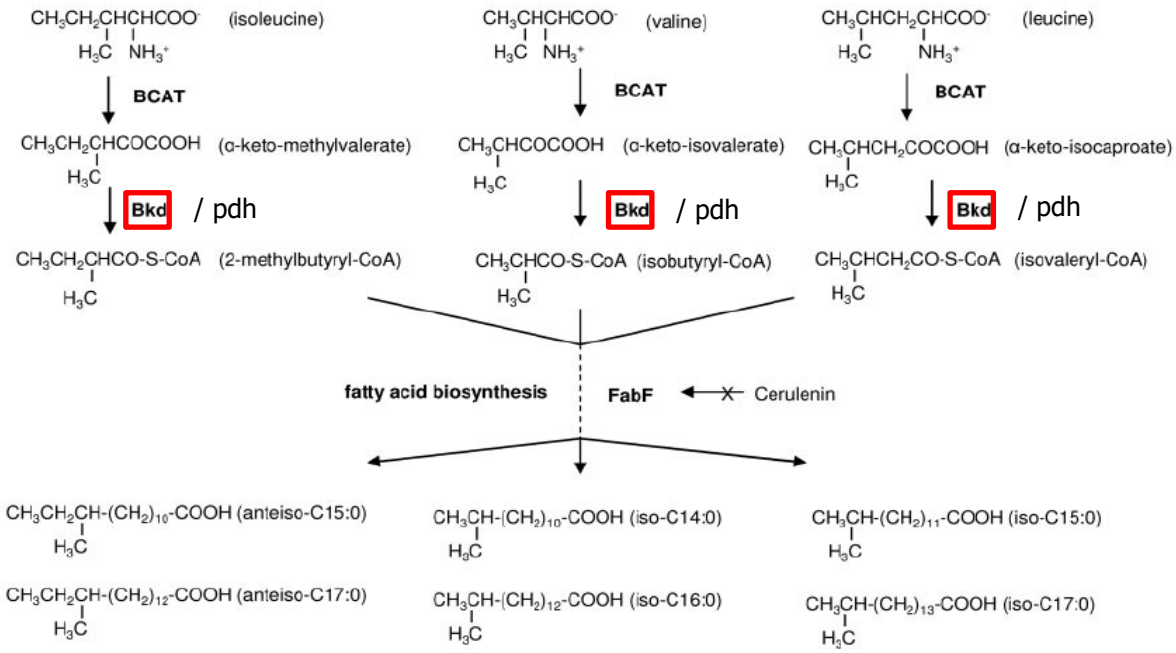


Fig. 9 : ***Chez S. aureus lpdA permet la synthèse des acides gras branchés à partir des acides aminés branchés en utilisant deux complexes d'enzymes homologues, Bkd et Pdh (145).*** *Le complexe Bkd est composé de 4 sous-unités.*

Le mutant *lpdA* était incapable de s'adapter à l'anti-FASII. Chez ce mutant deux défauts sont observés : profil en acides gras différent du WT en milieu BHI, sensibilité aux acides gras exogènes et profils atypiques, ce qui serait lié à une prise des acides gras exogènes inefficace. Nous avons fait séquencer le génome du mutant *lpdA*. Le séquençage a révélé l'existence de mutations secondaires chez la souche, notamment une mutation ponctuelle dans le gène *fakA*. Nous essayons actuellement de déterminer si cette mutation secondaire agit comme suppresseur, c'est-à-dire qu'elle permet à la bactérie de mieux survivre. Pour pouvoir répondre à cette question, nous allons devoir reconstruire la souche et effectuer une complémentation, une démarche qui a été initiée dans l'équipe. Nous avons récemment reçu une souche ayant une insertion dans le gène *lpdA* gracieusement fourni par le Dr. Wilkinson (Illinois State University) qui a permis de mettre en avant un phénotype moins marqué, mais avec un retard d'adaptation de plusieurs heures. Nous avons effectué un séquençage de la région comprenant *fakA* qui s'avère identique à la séquence de la souche parentale. Aucun lien n'est à ce jour montré concernant les gènes *lpdA* et *fakA*. Si ce lien est montré une étude complémentaire pourrait être envisagée afin de mieux comprendre le lien entre la voie FASII et la voie *fak*.

Le gène ***bfmAB*** **(1465)** est une 2-oxoisovalerate déshydrogénase (voir figure 8). Cette enzyme est, comme *lpdA* une sous unité du complexe (Bkd) ayant pour rôle la dégradation des acides aminés branchés (Valine, Leucine et Isoleucine). Le mutant *bfmAB*, comme *lpdA*, n'est pas capable de sortir de la latence en présence du SerFA-Tric. Le séquençage du gène *fakA* dans ce mutant est sauvage, ce qui suggère que l'incapacité des mutants dans cet opéron de s'adapter aux anti-FASII est réellement associée au complexe Bkd. Le rôle de ce complexe continue à être étudié par notre équipe. Une hypothèse simple est que ces mutatns soient fondamentalement plus « fragiles » et sensibles aux acides gras que la bactérie sauvage, ce qui empêcherait leur adaptation aux anti-FASII.

Un autre gène lié aux acides gras ramifiés est *codY*.

codY est dans un opéron et en aval de *xerC* (voir x*erC* précédemment discuté). Le régulateur CodY joue un rôle central dans la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Ce régulateur est un répresseur qui répond à la concentration en acides aminés branchés dans la cellule (Fig. 11).

En présence d'acides aminés branchés (BCAA), CodY est fixé sur l'ADN réprimant ainsi l'expression d'environ 5% des gènes (246). Il réprime la transcription d'*agrBDCA* et ARNIII durant la phase exponentielle. Chez le mutant *codY* une surexpression de *agr* durant la phase exponentielle a été observée (247). En période de famine, la diminution de la quantité des BCAA va entraîner la perte de la liaison entre CodY et l'ADN. La répression n'a donc plus lieu et la synthèse des gènes réprimés par CodY va s'exprimer. Ces gènes sont exprimés lors du passage à la phase stationnaire, et en l'absence de nutriment la division cellulaire s'arrête.

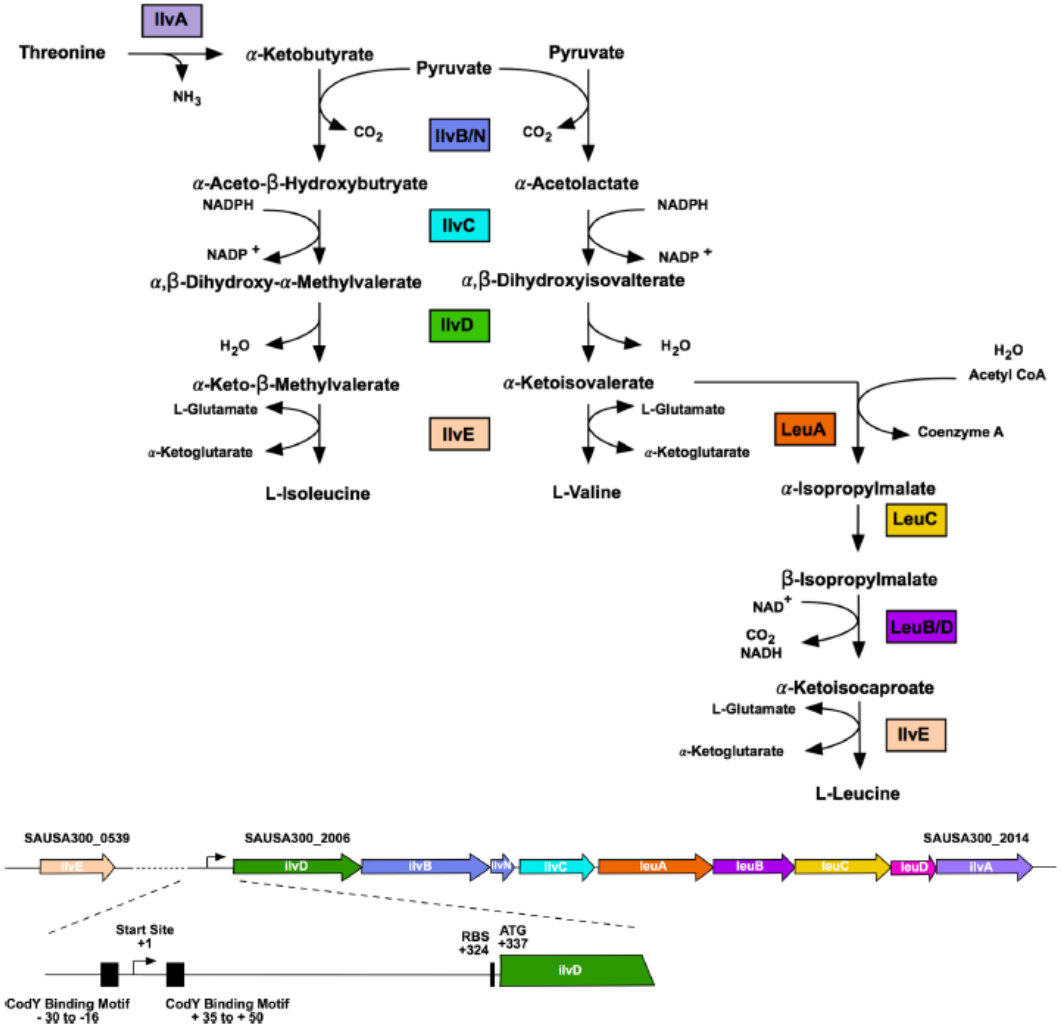


Fig. 10 : ***Organisation de l'opéron ilv-leu chez S. aureus (248).*** *La partie haute représente la voie de synthèse des BCAA, la partie basse représente le contexte génomique des gènes de la synthèse des BCAA.*

La délétion de CodY permet une augmentation de la transcription du gène de synthèse des acides gras branchés leucine et isoleucine. En effet, CodY réprime la synthèse des BCAA par liaison à deux régions en amont de *ilvD* (site de transcription) et deux régions à l'intérieur de l'opéron à proximité de *ilvC* et *leuC* (Fig. 10). La délétion de CodY ne permet plus cette répression. D'après cette même étude la mutation de CodY n'entraînerait pas de retard de croissance. L'hypothèse du retard d'adaptation dans nos conditions pourrait venir de la régulation de la réponse stringente. En effet lors d'un stress la réponse stringente peut être mise en place. Elle est liée à CodY qui, en son absence met en jeu cette voie.

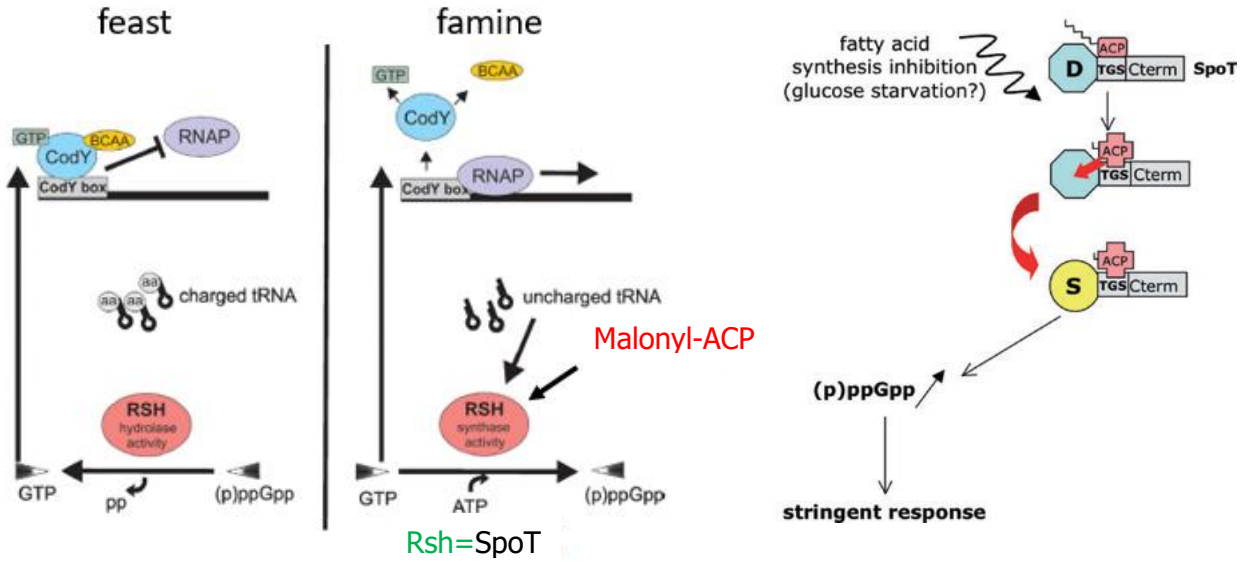


Fig. 11 : ***Schéma représentant l'interaction entre la réponse stringente et le répresseur CodY.*** *En condition riche en nutriment, les niveaux de GTP et des BCAA sont élevés. Le répresseur CodY, en se liant à ces facteurs, montre une affinité pour l'ADN et inhibe l'activité polymérase. L'enzyme RSH devient inactive lorsqu'il y a une baisse en nutriments. La synthèse de (p)ppGpp et son accumulation amène à une diminution de la quantité de GTP et mène à une libération de CodY de l'ADN. Les gènes pouvant être exprimés sont essentiels à l'adaptation à une diminution de la quantité de nutriments. Le (p)ppGpp (produit à partir de GTP et d'ATP) inhibe la synthèse de GTP (249). Chez E. coli un lien entre la quantité de malonyl-ACP, le (p)ppGpp et la synthèse des phospholipides a été décrit. Le malonyl-ACP exerce un rétro contrôle négatif sur la synthèse des phospholipides en augmentant la production de (p)ppGpp. Le malonyl-ACP joue ce rôle par le lien entre l'ACP et l'enzyme Rsh comme décrit* (250).

La bactérie répond au stress nutritionnel par la production de ppGpp qui joue un rôle central dans le déclenchement de la réponse stringente et va entraîner un ralentissement de la croissance (251). Chez *E. coli*, la protéine RelA synthétise le (p)ppGpp en réponse à une baisse de la quantité d'acides aminés branchés. Le ppGpp réprime la voie de synthèse des acides gras chez *E. coli* (Fig. 12). D'après une étude éffectuée au laboratoire par Amit Pathania, il est démontré que l'utilisation de mupirocine (qui entraîne une augmentation du ppGpp) est responsable d'une augmentation du temps d'adaptation. Il est donc possible que l'adaptation que nous observons soit liée à la réponse stringente.

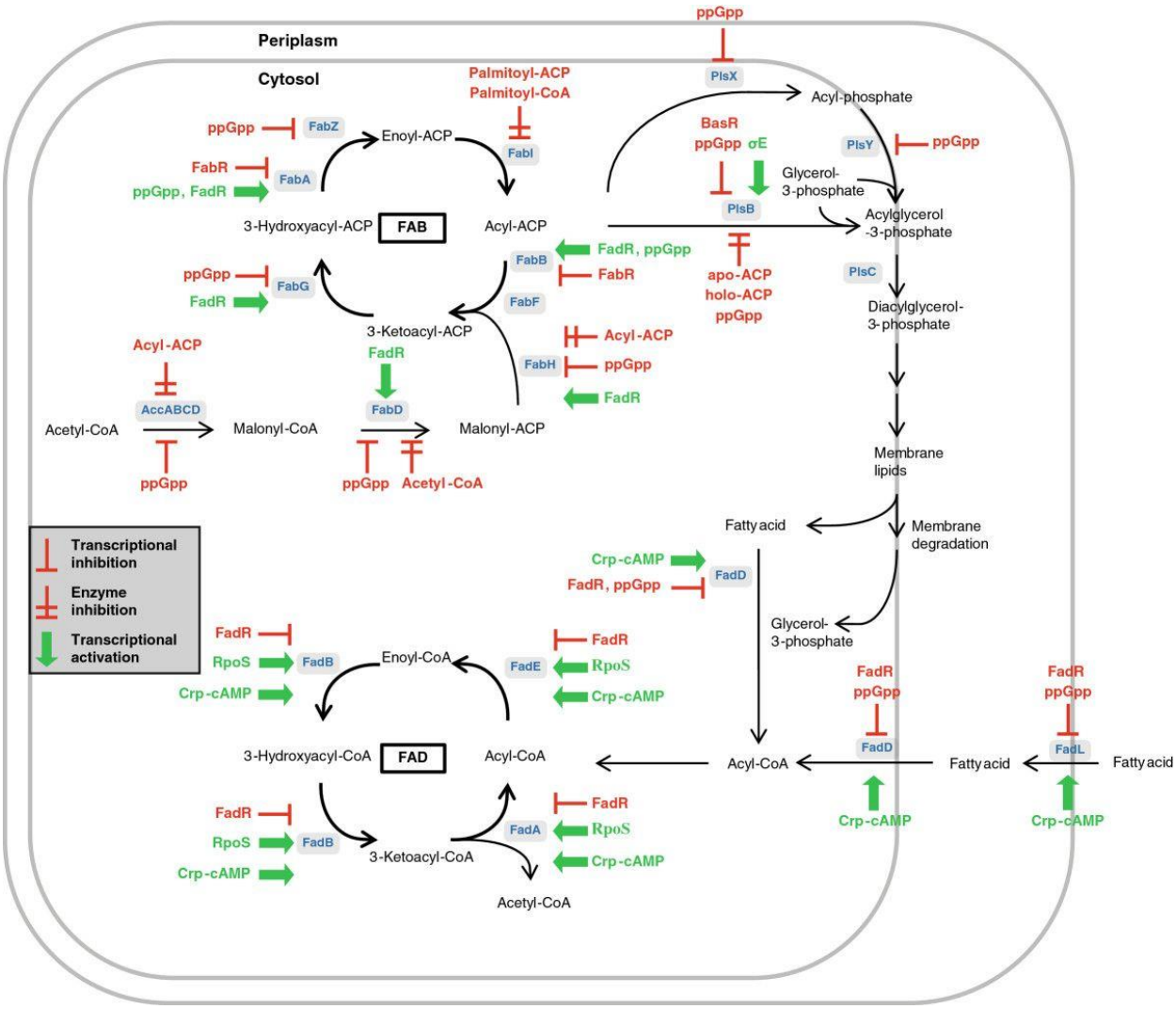


Fig. 12 : ***Une augmentation de la synshtèse du ppGpp chez E. coli par l'enzyme RelA provoque une inhibition de la voie FASII et de la synthèse des phospholipides (158).***

- Autres gènes du screening des mutants : Plusieurs gènes (dont *yjbH* et *trsBh*) ne sont pas décrits par la suite dû au manque d'information pouvant expliquer leur lien avec notre phénomène étudié. Nous avons néanmoins quelques informations sur certains d'entre eux.

Des mutations dans les gènes codant ***ypfP*** et ***ltaA*** ont provoquées un retard dans l'adaptation de *S. aureus* aux anti-FASII. Les deux gènes sont impliqués dans la synthèse des LTAs (Fig. 13). Les LTAs sont impliqués dans l'intégrité de la paroi, bien qu'ils ne semblent pas essentiels. En effet, les LTAs peuvent être fortement diminués ou absents, mais seulement si les WTA sont présents (252). Le retard dans l'adaptation de ces mutants face aux anti-FASII pourrait laisser penser que les LTAs jouent un rôle dans la fluidité membranaire. Les images de microscopie électronique (annexe) montrent une distance importante entre le cytoplasme et la paroi durant la période d'adaptation. Il est possible d'imaginer que l'absence des LTAs faisant le lien entre la membrane et la paroi pourrait déstabiliser les cellules pendant le processus d'adaptation. Une visualisation en

microscopie électronique du mutant *ypfP* ou *ltaA*, défectueux dans la synthèse des LTAs pourraient en partie répondre à cette interrogation.

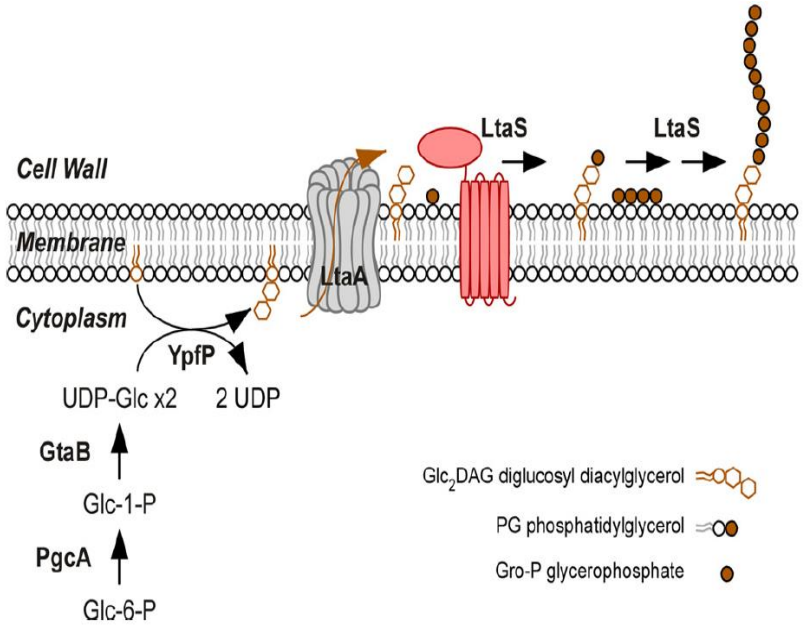


Fig. 13 : ***Schéma de la synthèse des LTAs (253).*** *La synthèse des LTAs nécessite l'enzyme YpfP, LtaA et LtaS.*

La protéine codée par ***mprF*** catalyse le transfert d'un lysyl depuis un L-lysyl-tRNA (Lys) à la membrane phosphatidylglycérol (PG). Cette réaction permet de produire un LysPG, qui est chargé positivement (Fig. 14). La charge positive du LysPG contribue à la virulence de *S. aureus* aux peptides antimicrobiens cationiques (CAMP) produits par l'hôte, et à certains microorganismes compétiteurs (voir page 43 de l'introduction). Cette modification de la charge peut modifier l'accessibilité des acides gras (chargés négativement), et ainsi être responsable pour le retard de l'adaptation de la souche *mprF* aux anti-FASII.

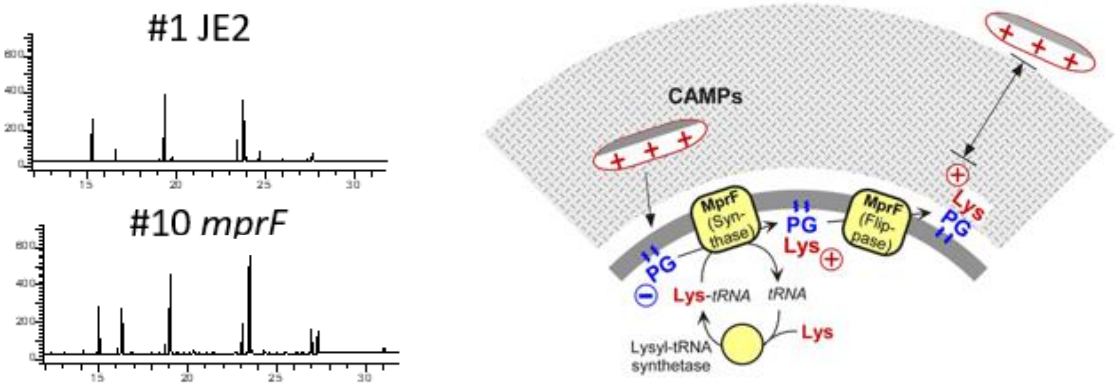


Fig. 14 : ***Profil en acide du mutant mprF comparé à la souche WT JE2. Schéma représentant le rôle de mprF qui permet l'ajout d'une charge (lysine) au PG (254).***

Le gène ***lspA*** code pour une sous unité du complexe Lsp qui est une peptidase de peptide signal lors de la synthèse de lipoprotéines. Ce complexe catalyse le clivage de peptides signaux des Prolipoprotéines membranaires afin de produire une lipoprotéine (Fig. 15). Le motif reconnu est : -Xaa-Yaa-Zaa-|- Cys- ou Xaa est hydrophobe (préférentiellement Leucine), Yaa (Alanine ou Sérine) et Zaa (Glycine ou Alanine), avec des chaînes petites, ou neutres. Le retard d'adaptation de ce mutant aux anti-FASII (environ 2h) pourrait être dû à une perturbation membranaire lorsque des formes intermédiaires des lipoptrotéines s'accumulent. Cette possibilité pourrait être exploré dans un premier temps par des sondes fluorescentes « live-dead ».

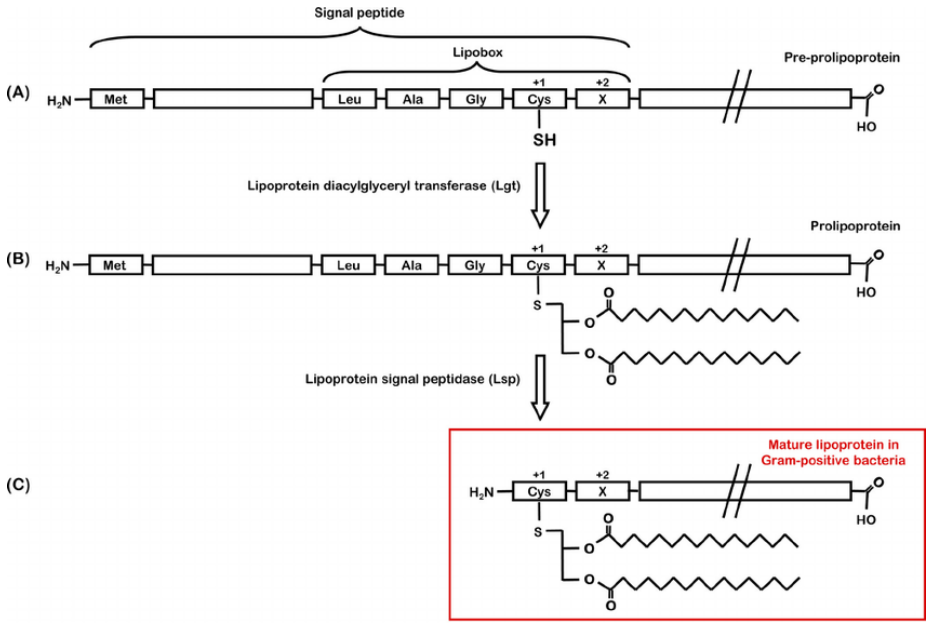


Fig. 15 : Biosynthèse des lipoprotéines bactériennes (255). *La peptidase Lsp permet le clivage du signal peptide en libérant la cystéine (résidu terminal formant les lipoprotéines matures des bactéries Gram-positive).*

- La synthèse des glucides

Le gène ***fba*** fructose code pour une fructose-bisphosphate aldolase. Elle permet la condensation d'un dihydroxyacétone phosphate (DHAP ou glycérone-phosphate) avec un glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) pour former un fructose 1,6-bisphosphate (FBP) dans la gluconéogénèse, et inversement dans la réaction de glycolyse. Le retard d'adaptation aux anti-FASII (3 h) du mutant *fba* pourrait suggérer que la voie de glycolyse intacte participerait dans la reprise de croissance. Nous verrons plus loin que d'autres gènes de glycolyse pourraient être impliqués dans l'adaptation aux anti-FASII.

La flexibilité génétique liée à des changements phénotypiques ?

Les gènes suivants ont montré un phénotype qui n'est pas resté stable après répétition des tests de croissance : *recG*, *purB.*

recG : ce gène code pour une hélicase qui permet la recombinaison et la réparation de l'ADN. Son rôle est essentiel au niveau de l'origine de réplication en permettant l'accès de l'ADN à la polymérase. Cette enzyme intervient aussi lors d'un blocage, d'un dommage au niveau de la fourche de réplication ou lorsqu'il y a un stress. Chez le mutant *recA* (qui a aussi un rôle de réparation de l'ADN) (256,257) la réponse SOS est induite, et des mutations ponctuelles sont stimulées. Il est possible que ces mutations soient liées à notre phénotype instable. Il est aussi intéressant de noter que *recG* est en amont de l'opéron contenant des gènes de synthèse de la voie FASII comme *fabD* et *fabG* (Fig. 16).

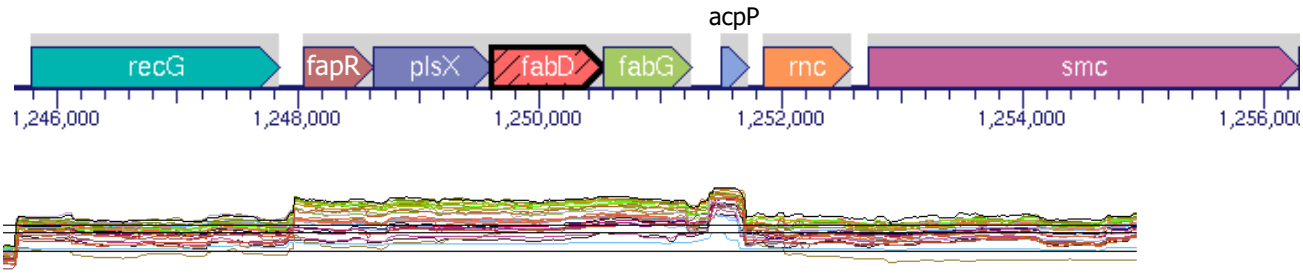


Fig. 16 : ***Schéma de l'opéron de recG, ce gène est situé en amont de gènes de la voie FASII (241,258).*** *L'expression de recG semble indépendante des gènes de FASII.*

PurB est une adénylosuccinate lyase qui participe à la voie de synthèse de l'AMP (qui fait partie du métabolisme de la purine), à partir d'adénylosuccinate (ou d'IMP transformé en adénylosuccinate par une adénylosuccinate synthase) (Fig. 17). Elle joue donc un rôle majeur dans la production de purine nécessaire à la réplication de l'ADN.

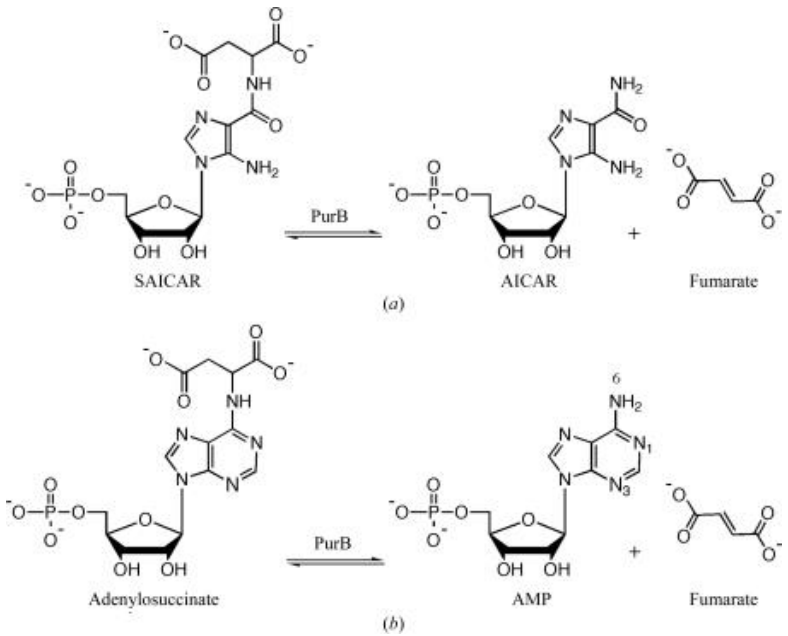


Fig. 17 : ***PurB catalyse 2 réactions : la conversion du SAICAR en AICAR qui sont des intermédiaires de la voie de synthèse de l'AMP et du GMP et de l'adenylosuccinate en AMP avec une libération de fumarate à chaque fois (259).***

Protéomique

Une étude protéomique a été entreprise dans le but de déterminer les voies métaboliques mises en œuvre durant l'adaptation. Les différentes conditions étudiées sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Souches étudiées	Conditions
JE2 (WT)	BHI (DO_{600nm} 1)
	FA (DO_{600nm} 1)
	SerFA (DO_{600nm} 1)
	FA-Tric 2h
	SerFA-Tric 2h
	FA-Tric 4h
	SerFA-Tric 4h

Tab. 2 ***: Tableau résumant les différentes conditions étudiées.*** *Dans le but de connaître le rôle des FA sur le stress et le pouvoir tampon du sérum, toutes les combinaisons ont été testées.*

L'analyse des résultats de cette expérience est toujours en cours. Cependant, une information remarquable qui est déjà sortie de cette expérience concerne l'expression de la pompe à efflux des acides gras récemment caractérisée, FarE (260). Comme décrit, l'expression de cette pompe est très augmentée en présene des acides gras libre (260), et ce, en présence ou en absence d'un anti-FASII. En revanche, l'expression est éteinte lorsque le sérum est présent, indiquant que les acides gras exogènes pourraient être disponibles pour incorporation dans les phospholipides (voir article N°2).

Les gènes les plus modulés en présence d'anti-FASII en SerFA-Tric sont présentés en comparaison avec leur expression en SerFA dans les tableaux ci-dessous. Cette liste a été réalisée en comparant la moyenne du comptage des peptides en SerFA-Tric 2 et 4 h avec ceux détectés en SerFA (sans anti-FASII). Un seuil limite a été choisi d'un minimum de 5 peptides en faisant la somme moyenne SerFA-Tric + SerFA. Une analyse plus détaillée est néanmoins en cours.

Gènes principalement surexprimés en SerFA-Tric (2 et 4h) par rapport à SerFA					
gènes		**Rapport SerFA-Tric/SerFA**	**Niveau d'expression**	**Fonctions**	
numéro	**nom**				
2278	*hutU*	10	12,5/1,2	Urocanate hydratase	Métabolisme énergie (histidine)
1975	-	9	15,6/1,7	Leukocidine LukGH sous-unité H	Production toxine (sécrétée) et résistance (phagique)
0194	-	6	9,8/1,7	Perméase sucrose	Apport en sucre
1679	*acsA*	4	10,3/2,5	Acétyl-CoA synthétase	Métabolisme des sucres (pyruvate)
RS10500	-	3	27,1/8,5	Protéine MAP	Immunomodulateur qui interfère avec les cellules T
0772	*clfA*	3	7,6/2,5	Clumping factor A production d'amas bactérien	Facteur de virulence
1901	*aldA2*	3	10,1/3,5	Aldéhyde déshydrogénase	Stress / osmoprotectant
0170	*aldA*	3	16/5,7	Aldéhyde déshydrogénase	
0190	ipdC	3	10,6/4	Indolepyruvate décarboxylase	Métabolisme des sucres (pyruvate)
2327	-	2	9,1/3,7	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	Stress
0885	*fabH*	2	17,3/7,2	FabH	Initiation FASII
2491	*ald*	2	33,5/14,5	1-pyrroline-5-carboxylate déshydrogenase	Synthèse staphyloxanthine
2486	*clpL*	2	36,8/16	Protéine chaperone	Stress / protéines
2455	*fbp*	2	11,1/5	Fructose 1,6-bisphosphatase	Synthèse des glucides
0877	*clpB*	2	62,5/28,7	Protéine chaperone	Stress / protéines
1656	*uspA1*	2	17,2/8,2	Protéine universelle de stress réplication et recombinaisons	Stress / métabolisme ADN
0955	*atl*	2	12,5/6	Autolysine	Division cellulaire
1306	*sucA*	2	12,6/6,5	2-oxoglutarate déshydrogénase E1	Métabolisme énergétique
0992	-	2	8,2/4,2	Lipoprotéine liée à la paroi Ségrégation chromosomique	ADN / Division cellulaire
2144	*amaP*	2	39,1/20,2	Protéine Asp23 : choc alcalin	Stress / Enveloppe

Tab. 3 ***: Tableau résumant les 20 gènes les plus sur-exprimés en SerFA-Tric par rapport à SerFA et leurs fonctions.*** *En orange les gènes liés au stress cellulaire sont rassemblés, en vert au mécanisme énergétique et en bleu à la division cellulaire.*

Ce tableau nous permet de faire ressortir plusieurs voies mises en jeu pendant les 4 premières heures de l'adaptation aux anti-FASII.

-**Stress :** De nombreuses protéines du stress sont sur-exprimées comme les gènes SAUSA300_1901, SAUSA300_2327, SAUSA300_2486, SAUSA300_0877, SAUSA300_2144. Ceci peut facilement s'expliquer au vu du changement physiologique que subissent les bactéries. La baisse de synthèse des acides gras endogènes entraînerait des modifications de la fluidité membranaire. Il est possible que ces modifications soient responsables d'un stress osmotique (voir microscopie électronique).

-**FASII bloquée** : Une plus forte expression de FabH pourrait être une réponse de la bactérie à la baisse de la synthèse des acides gras endogènes due au blocage de la voie FASII.

-**Métabolisme énergétique des sucres** : Nos résultats indiquent que des gènes de glycolyse sont plus fortement exprimés pendant la prédiode de latence, ce qui indique que les bactéries sont métaboliquement actives. La production de pyruvate et d'acétyl-CoA confirme que la voie est entièrement fonctionnelle. Le triclosan est connu pour induire un stress aux bactéries, qui comprend la génération des ROS (espèces réactives oxygénées) (261). Ceci pourrait expliquer pourquoi les souches mutantes SAUSA_903 et SAUSA300_904 défectueuses respectivement pour un ClpXP adaptor protein YjbH et pour une « hémoglobine tronquée » (trouvé dans le screening) auraient un retard d'adaptation. Le pyruvate est aussi nécessaire à la production des acides aminés branchés eux même essentiels pour la synthèse des acides gras branchés. Cette augmentation pourrait être liée au blocage de la voie FASII que la bactérie essaierait de compenser par une surproduction de ces acides aminés.

-**Facteurs de virulence** : Un facteur de virulence est surexprimé (SAUSA300_0772) en SerFA-Tric.). La plupart des gènes de virulence sécrétés comme c'est le cas ici, sont exprimés en phase stationnaire lors d'une diminution de la quantité de nutriments dans l'environnement. Il est possible d'imaginer que l'arrêt de la synthèse des acides gras pourrait induire des mécanismes similaires à ceux mis en œuvre en phase stationnaire.

-**Division cellulaire :** Certains gènes de la division cellulaire semblent sur-exprimés en condition SerFA-Tric (SAUSA300_0955 et SAUSA300_0992). Le blocage anormal de la division cellulaire en tétrade pourrait être corrélé avec une perturbation de l'expression des autolysines.

Gènes principalement sous exprimés en SerFA-Tric (2 et 4h) par rapport à SerFA					
gènes		Rapport SerFA/SerFA-Tric	Niveau d'expression	Fonctions	
numéro	nom				
2343	*narG*	153	38,2/0,2	Nitrate reductase sous unité alpha	Métabolisme énergétique
0274	-	47	41/0,8	Protéine hypothétique	-
0279	*esaA*	28	17,2/0,6	Protéine de sécrétion de type VII	Système de sécrétion
2346	*nirB*	27	26,7/0,1	Nitrite reductase sous unité large	Métabolisme énergétique
2342	*narH*	18	17,5/0,05	Nitrate reductase sous unité beta	
0486	-	7	9,7/1,3	Protéine S1 de liaison à l'ARN	Modulation des ARN
1094	*pyrC*	6	13,/2,3	Dihydroorotase	Synthèse pyrimidine
2463	*ddh*	5	20,7/4,1	Lactate déshydrogénase	Métabolisme énergétique
0234	*hmp*	5	17,7/3,6	Nitrique oxide dioxygénase	Détoxification liée au NO
2526	*pyrD*	4	12,2/3,6	Dihydroorotate déshydrogénase (quinone)	Synthèse pyrimidine
0235	*ldh1*	4	41,5/10,3	L-lactate déshydrogénase	Métabolisme énergétique
0829	*lipA*	4	19,7/5,1	Lipoyl synthase LipA	Synthèse acide lipoique
1536	*mtaB*	4	18,2/4,8	tRNA -L-thréonylcarbamoyladenosine-C-methylthiotransferase	Modification ARNt
1886	*pcrA*	4	11,2/3,1	DNA hélicase PcrA	Réplication et réparation de l'ADN
1037	*pheS*	3	13/3,8	Phénylalanine -tRNA ligase	Modification ARNt
2074	*rpmE2*	3	11,2/3,3	50S protéine ribosomale L31 type B	Synthèse protéine ribosomale
0769	-	3	16,5/5	Domaine DUF5067	Eléments mobiles
1096	*carB*	3	33,7/10,2	Carbamoyl-phosphate synthèse UMP	Synthèse nuclétotides
0921	*prfC*	3	11,7/3,6	Peptide chaîne facteur de libération 3	Terminaison traduction protéique
1687	*ftsK*	3	15,7/4,8	DNA translocase	Division cellulaire

Tab. 4 : ***Tableau résumant les 20 gènes les plus sous-exprimés en SerFA par rapport à SerFA-Tric et leurs fonctions.*** *En violet les gènes liés à la synthèse de l'ADN et des protéines sont rassemblés, en vert au mécanisme énergétique et en bleu à la division cellulaire.*

L'analyse du tableau ci-dessus permet de faire ressortir plusieurs voies dont l'expression est diminuée en condition SerFA-Tric comparé à SerFA.

-**Traduction/réplication ADN** : Une diminution de la synthèse des ribosomes est observée (SAUSA300_0486, SAUSA300_2074), ainsi qu'une diminution de la production d'hélicase (SAUSA300_1886) et des nucléotides (SAUSA300_1094, SAUSA300_2526). Ces différences indiquent un ralentissement de croissance.

-**Division cellulaire** : La diminution de l'expression de la protéine FtsK (SAUSA300_1687) mais pas d'autres protéines impliquées dans la division pourrait suggérer un défaut de la séparation cellulaire. Ceci est cohérent avec les images de microscopie (problème de division cellulaire) et au phénotype du mutant XerC ressorti de notre screening. FtsK intervient dans la division cellulaire ainsi qu'au niveau de la ségrégation de l'ADN (262). Il est utile de noter que chez *E. coli,* XerC qui a pour fonction la résolution de la dimérisation chromosomique est dépendant de FtsK (263-266).

Cette étude protéomique révèle que cette période de latence, initialement qualifiée de « dormance », reste toutefois une période où les cellules sont métaboliquement actives.

Les changements d'expression de nombreux facteurs évoquent un rôle de régulation par la stringente et le ppGpp, tel que confirmé par les résultats d'Amit Pathania de l'équipe.

Dans le tableau 5, A. Pathania et A. Gruss ont rédigés une liste des protéines régulées par le ppGpp (267,268), on retrouve parmi ces protéines, les protéines affectées lors de la période de latence en SerFA-Tric. Ces résultats confortent un rôle de la voie stringente dans la latence.

Proteins with altered expression in (p)ppGpp (Tobias et al., Plos Pathogens, 2012)	**Expression change in (p)ppGpp *versus* uninduced**	**Expression change in SerFA-Triclosan *versus* SerFA**
50 S Ribosomal Proteins L5, L6, L10, L11, L13, L15, L16, L18, L29	Decrease	Decrease
30 S Ribosomal Proteins S6, S7, S8, S12, S13, S15, S18, S19	Decrease	Decrease
DNA helicase RecQ	Decrease	Decrease
Holliday junction branch migration protein RuvA	Decrease	Decrease
ATP-dependent DNA helicase CshA	Decrease	Decrease
Guanosine monophosphate reductase GuaC	Decrease	Decrease
Universal stress protein UspA	Increase	Increase
Peptide ABC transporter permease	Increase	Increase
Threonine synthase ThrC	Increase	Increase

Tab. 5 : ***Liste des protéines et de leur expression durant la phase d'adaptation.*** *Le changement d'expression en présence de Triclosan est identique à celui en présence de ppGpp chez S. aureus.*

Conclusion

D'une manière générale, les résultats du screening de la banque des 2000 mutants et de l'étude protéomique, ont permis d'identifier des facteurs nécessaires et/ou impliqués dans l'adaptation de *S. aureus* aux anti-FASII par l'utilisation des acides gras exogènes. Basé sur ces résultats encore préliminaires et couplés avec d'autres études effectuées en parallèle au laboratoire, nous faisons deux hypothèses : d'abord, que la division cellulaire est affectée par l'anti-FASII (observation par microscopie éléctronique Fig. 1 de l'annexe et (116)). La diminution de la quantité de FtsK pendant la première période de latence, et le retard d'adaptation d'un mutant *xerC* sont cohérant avec cette hypothèse. La deuxième hypothèse est que la réponse stringente pourrait être impliquée dans la période de latence. Ceci est suggéré par des changements dans de nombreux gènes sous contrôle de RSH, la principale protéine responsable de la synthèse et dégradation de ppGpp (A. Pathania, non-publié)(267). Les résultats d'Amit Pathania utilisant des rapporteurs de la réponse stringente soutiennent d'avantage cette hypothèse. Cette induction pourrait être la raison pour la période de latence.

En parallèle de l'analyse des résultats de cette expérience, une autre étude avec une cinétique plus longue (jusqu'à 10 h) est aussi en cours. Il nous semble intéressant de faire dans l'avenir une étude comparant l'expression par protéomique d'un mutant *fabD* et la souche WT. Le mutant *fabD* ne montre pas un temps de latence avant de s'adapter aux anti-FASII, et donc n'aura pas un défaut de division. La diminution de la division cellulaire observée (responsable de la latence) pourrait suggérer que *fabD* joue un rôle de régulation dans l'adaptation.

Annexe

Mut$ BHI

Pos	Ref	Var	Score	Var_cov	Var_frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frameshift	Locus_tag	Gene_name	Function	snpEff_type	snpEff_impact
2639529	cggtgtggtgttccggtcgctggatccttcgtgtcgtggtgtggtgt	cggtgtggtgttccggtcgctggatccttcgtgtcgtggtgtggtgg	181.458	19.0	1.00	Deletion	ccacggacaccagagtaccaagcgag cggaataccacacaccgacacca gaagtaccggcgaacacca acacg	ccacggacaccagagtacc tagcgagcggcgaacacca acacg	PPTPEVPSEPET PTPTPEVPSEPE TPTPEPTPSEPS EPETPTP	PPTPEVPSEPET PTP		SAUSA300_2440	fnbB	Fibronectin binding protein FnbB	inframe_deletion	MODERATE

Mut$ SFA

Pos	Ref	Var	Score	Var_cov	Var_frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frameshift	Locus_tag	Gene_name	Function	snpEff_type	snpEff_impact
2699016	gcggtttacagttggatcttcgctccaactgcataagcgcactaatatatatagcta taaataaaagtacacacggtttacagttggatcttcgctccaactgcataa agcgcactaatatatataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaa	gcggtttacagttggatcttcgctccaactgcataagcgcactaatatatatagcta taaataaaagtacacacggtttacagttggatcttcgctccaactgcataa agcgcactaatatatataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaa	214.458	84.0	1.00	Deletion									intergenic_region	MODIFIER

Mut$ SFAT1

Pos	Ref	Var	Score	Var_cov	Var_frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frameshift	Locus_tag	Gene_name	Function	snpEff_type	snpEff_impact

Mut$ SFAT2

Pos	Ref	Var	Score	Var_cov	Var_frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frameshift	Locus_tag	Gene_name	Function	snpEff_type	snpEff_impact
460959	taataca	ta	214.458	24.0	1.00	Deletion	ggtaataca	ggta	GNT	G	yes	SAUSA300_0407		Exotoxin 15	frameshift_variant	HIGH
514557	ttatgaaaataaagcgatatg	ttatg	217.468	129.0	0.65	Deletion									intergenic_region	MODIFIER

Mut$ SFAT3

Pos	Ref	Var	Score	Var_cov	Var_frac	Type	Ref_nt	Var_nt	Ref_aa	Var_aa	Frameshift	Locus_tag	Gene_name	Function	snpEff_type	snpEff_impact
460959	taataca	ta	214.458	36.0	1.00	Deletion	ggtaataca	ggta	GNT	G	yes	SAUSA300_0407		Exotoxin 15	frameshift_variant	HIGH
52488	gaaatcgcggtgaaaaatcacaggaaatcgttgaaatcatcgtagtagtatc gcggcgaaaatcacgcgaaaatcaggaaatcgttgaaatcatcgta gtatcgcggcgaaaatcacgcgaaaatcaggaaatcgttgaaatcatcgta gtatcgtagtatcgcgcgaaaatcacgcgaaaatcaggaaatcgttgaaa atcgtagtatcgcgcgaaaatcacgcgaaaatcaggaaatcgttgaaa tcatcgtagtatcgcgcgaaaatcacgcgaaaatcaggaaatcgttgaaa at

Matériels et méthodes

Souches bactériennes et conditions de croissance

Les expériences ont été faites à partir de la souche USA300_FPR3757 (Université de Nebraska (234)). La solution d'acides gras ajoutée aux milieux est composée de C14 :0 (acide myristique), C16 :0 (acide palmitique) et de C18 :1 (acide oléique) ; stock 100 mM dilué en DMSO (diméthylsulphoxide). La solution est composée d'un mélange des trois acides gras avec un ratio de 1 :1 :1 puis dilué à 1 :200 dans les milieux liquides ou solides. La concentration finale des acides gras est de 0,5 mM. Tous les acides gras proviennent de Larodan Fine Chemicals (Sweden). Le séerum de veau nouveau né (Sigma-Aldrich, France) a été ajouté aux milieux (10% de concentration finale). Triclosan (Irgasan ; Sigma-Aldrich) est utilisé à 0,25 mg par mL en culture liquide. Cette concentration est équivalente à environ 15 fois la CMI pour *S. aureus* JE2 FPR3757 et Newman en milieu BHI (207).

Screening de la banque de mutant NARSA

La banque des mutants insertionnels (http://app1.unmc.edu/fgx/tools.html) de *S. aureus* a été gracieusement fournie par BEI resources (234,269,270). La banque est composée de 1920 mutants de la souche USA300_FPR3757 de transposition. La banque a été criblée sur boîte agar en milieu BHI et SerFA-Tric. Elle est composée de 5 microplaques 384 puits. Un passage en plaque 96 puits a été réalisé afin de faciliter les étapes suivantes. Par la suite, à l'aide d'une brosse pour plaque 96 puits, une plaque en BHI érythromycine à 5 mg/ml est ensemencée. Cette plaque est cultivée durant une nuit à 200 rpm à 37°C. De cette culture une nouvelle brosse est utilisée pour déposer une gouttelette de chaque puits sur une boîte agar en BHI et en SerFA-Tric. Les boîtes ont été ensemencées à 37°C pendant 5 jours. Une photo a été prise à différents jours après dépôt afin de suivre l'évolution des cultures sur les deux types de boîtes.

Vérification de la position des transposons dans le gène

Il a été vérifié que les transposons des gènes ressortis de ce screening soient bien dans les gènes étudiés. Pour cela, il a été en œuvre une vérification par PCR. Pour chaque transposon testé, un couple d'oligonucléotides a été créé dans le gène étudié aux extrémités du transposon. Si le transposon est présent dans le gène étudié, celui-ci est amplifié (3,4 kpb). Si ce n'est pas le cas la bande amplifiée est de seulement 200 pb.

Nom des gènes	Début du gène	Fin du gène	Insertion du transposon	Début de la séquence	Séquence oligonucléotide
muts 5'	1 306 747	1 309 270	1 307 319	1 307 219	CAGAAACAATAACAGTCAGGG
muts 3'				1 307 500	TTGGTGTTTTCGTTTCGTCC
mutL 5’	1 309 282	1 311 292	1 309 783	1 309 183	CTACAAATTAAAAATTTGAATTTATC
mutL 3’				1 309 350	TCTTTCAACTACTTCACCTGC
fakB1 5'	813 389	814 256	813 773	813 673	TGGAAGTTATCAATCTAGTTATC
fakB1 3'				813 900	CTTTTTTGTAAATTCTTTAAGTCAT
fakB2 5'	1 450 715	1 449 875	1 450 432	1 450 332	GTGTTGTATTTGATACCCTAAA
fakB2 3'				1 450 532	AGTCAGCCAGCCATAGGTG
recG 5'	1 225 776	1 227 837	1 226 020	1 225 920	AATACAGTGATTGATTTGAATCAA
recG 3'				1 226 120	AGTTTGATTTAATTCGATTTTCTTT
bfmAB 5'	1 620 347	1 619 363	1 619 966	1 619 866	GATGATAATAAAAGCCCTTTAG
bfmAB 3'				1 620 066	TATTAGTGAAGCTGCGAAAATG
lpdA 5'	1 622 776	1 621 354	1 621 716	1 621 616	TTTAAATGGTACTTTAAAACTTTAA
lpdA 3'				1 621 816	AAATTACAATTGGCACATGTTG
argR 5'	1 625 074	1 624 621	1 625 052	1 624 952	AGTTGCTTGAGTGACATTTAAA
argR 3'				1 625 152	GTAAAGGTGTTTAGTAGTCGTA
xerC 5'	1 256 719	1 257 616	1 256 892	1 256 792	CATATCAAGATGACTTAATTCAG
xerC 3'				1 256 992	TAATAATGTTCTCATCAAGCGT
codY 5'	1 259 651	1 260 425	1 260 314	1 260 214	ACATATCTTTGAAGAACTTGGC
codY 3'				1 260 414	TTTCTAATTCATCTAAGAATTTTTC
purB 5'	2 054 221	2 052 925	2 053 923	2 053 824	TATTTATAATTTTTTGCTTTTCAGC
purB 3'				2 054 023	TATTTATAATTTTTTGCTTTTCAGC
dsbA 5'	992 683	991 876	992 518	992 418	GCTGCTTTATAAGCTAGGGC
dsbA 3'				992 618	TAAAATCGAAATTTATTCATTTTTC
trsHb 5'	993 071	992 705	992 852	992 752	AAATAATCTCCAACACCTTGTG
trsHb 3'				992 952	AGAAACAAGTCGTAAACAAAAAC
lspA 5’	1 191 741	1 192 233	1 192 030	1 191 930	ATGACATTTTTCTTTATTATTACC
lspA 3’				1 192 130	TGGAAAATCATAACCAAAAATATTT
fba 5'	2 242 289	2 241 428	2 242 283	2 242 183	TCTAAAATTGCTTGAGTGAATTC
fba 3'				2 242 383	ACATTTAATCTGCAGTATTTCAAT
ypfP 5'	1 008 187	1 007 011	1 007 404	1 007 304	GGAATACAACGGGCGAAAC
ypfP 3'				1 007 504	AAGTGCAAATGCACAAGTAGTT
ltaA 5’	1 007 052	1 005 843	1 006 997	1 006 897	AATGGATGTAACTGTTGGCAA
ltaA 3’				1 007 052	ATGGAAAGGTTCCTTTATATGC
mprF 5'	1 381 454	1 383 977	1 382 617	1 382 517	CGATTGTTTACGATGCTTTATAT
mprF 3'				1 382 717	TTAAAATATATGAAGCGTAAGTGA

Détermination des profils des acides gras.

La détermination des acides gras estérifiés des cellules fut établie selon la méthode suivante. Brièvement, 1-2 ml de cultures de *S. aureus* (OD600 = ≥1) ont été centrifugés, lavés une fois dans du NaCl à 0,9 % contenant 0,02 % de Triton X-100, puis lavés deux fois dans du NaCl à 0,9 %. Les culots cellulaires ont été traités avec 0,5 ml de méthoxyde de sodium 1 N. De l'heptane (200 ml) a ensuite été rajouté avec du 10-undécénoate de méthyle (Sigma-Aldrich) comme étalon interne, agité au vortex pendant 1 min et centrifugé. Les esters méthyliques d'acides gras ont été récupérés dans la phase heptane. Les analyses ont été réalisées en mode d'injection split-splitless sur un chromatographe en phase gazeuse AutoSystem XL (Perkin-Elmer) équipé d'une colonne capillaire ZB-Wax (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm, Phenomenex, France). Les données ont été enregistrées et analysées par TotalChrom Workstation (Perkin-Elmer). Les pics d'acides gras de *S. aureus* ont été détectés entre 12 et 30 minutes d'élution.

Séquençage de l'ADN

Le séquençage de la souche JE2 et du mutant *mutS* a été réalisé en culture BHI, SerFA et SerFA-Tric (publication n°1 et 2) après 12 h de culture en SerFA-Tric et à Do600=1 en BHI et serFA. L'extraction d'ADN a été faite en utilisant le kit Qiagen « DNeasy® Blood & Tissue Kit » en suivant le protocole du fabricant, après une incubation de 30 minutes à 37 °C avec 0.1 mg de lysostaphine/ml. L'ADN génomique a été séquencé par Illumina HiSeq (GATC-Biotech, Konstanz, Germany). Le séquençage réalisé est « paired-end » et les reads sont composés de 150 paires de bases. Les reads ont été analysés en utilisant le programme « Variation Analysis » proprosé par Patricbrc.org. Bowtie 2 (Patricbrc.org) a été utilisé pour aligner les séquences et « SAMtools » pour identifier les SNPs qui diffèrent du contrôle JE2 BHI de la séquence référence (GenBank Nucleotide accession codes NC_007793.1 and NC_009641 respectively). Les différences ont été soustraites afin de distinguer les mutations propres à nos milieux étudiés. Les variants identifiés sont représentés sur au moins 80 % des reads pour une présence détectée d'au moins 10 reads.

Protéomique

Extraction protéique et traitement des échantillons :

Après culture de la souche JE2 USA300_FPR3757 Δ*spa* dans les différentes conditions voulues en quatre réplicas. Après 2 lavages en PBS (centrifugation à 5000 rpm pendant 4 min à température ambiante) les culots sont resuspendus dans une solution de DNAse I à 0,1 mg/ml, lysostaphine à 100 µg/mL, inhibiteur de protéase « mini protean » et triton X100 à 1 % pendant 45 minutes à 37°C. Ensuite une étape au fastprep est réalisée, 4 lyses à puissance 6 m/s pendant 30 secondes. La quantification des protéines fut faite par la technique de bradford. 10 µg de protéines furent déposés dans chaque puits de gel d'acrylamide. Les bandes de gels issues de la migration courte ont été découpées en petits morceaux (environ 2 mm x 2 mm), puis lavées 2 fois 15 min avec

100 µl de 50 % ACN/50 mM bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3). Les ponts disulfure éventuels des protéines sont réduits à l'aide du dithiothréitol à 56 °C pendant 30 min (DTT, 10 mM finale), puis les cystéines libres sont alkylées avec de l'iodoacétamide à température ambiante pendant 1 h dans l'obscurité (IAM, 50 mM finale). Les bandes sont lavées avec 100 µl 50% ACN/50 mM NH4HCO3 puis 30 µl d'ACN et séchées. La digestion est réalisée avec 100 ng de trypsine sur la nuit à 37 °C. La digestion est arrêtée par ajout de 0.1 % TFA. Les peptides sont extraits avec 40 % acétonitrile/0.1 % TFA puis 100 % ACN. Les extraits peptidiques sont séchés au concentrateur (speed vac) puis repris dans 50 µl de tampon de chargement chromatographique (2 % ACN + 0.1 % FA). 10 µl sont placés en barrette de tubes et 4 µl de chaque échantillon sont injectés sur le système LC-MS/MS.

Analyse LC-MS/MS (Lumos) : Condition LC **:** RSLC PepMap 100, C18, 3 µm, 75 µm x 50 cm tampon A: 2 % ACN / 0.1 % FA, Tampon B: 80 % ACN / 0.1 % FA, Tampon loading: 2 % ACN / 0.08 % TFA. Condition MS: run de 65 minutes en mode TOP speed en CID. Traitement des données LC-MS/MS et identification des protéines avec X!TandemPipeline

Analyse informatique KEGG :

L'analyse protéomique des voies a été faite à partir de l'option « Color Pathway » sur kegg.jp. Pour cela une moyenne des 4 réplicas a été faite à partir des résultats précédemment réalisés. Les noms des gènes ont été modifiés pour être acceptés par KEGG, et ont été mis sous le format « saa :SAUSA300_x ».

Discussion et perspectives

Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène de haute importance de par son coût économique aussi bien au niveau de la santé humaine que dans l'industrie agro-alimentaire. Le nombre croissant de souches résistantes à un nombre toujours plus grand d'antibiotiques nous mène de plus en plus souvent à une impasse thérapeutique. La recherche de nouvelles molécules ou de nouveaux mélanges de molécules pouvant fonctionner en synergie est devenue une affaire vitale. C'est dans ce cadre que nos recherches s'articulent, avec un objectif à long terme de développer une stratégie d'inhibition de cette bactérie pathogène.

En 2009 il a été observé que différentes bactéries à Gram-positif puissent utiliser les acides gras exogènes présents dans leur environnement, ce qui a rendu inefficace les anti-FASII *in vivo* (167). C'est à partir de ce moment-là qu'une polémique s'est installée concernant l'utilisation des anti-FASII. Depuis cette première publication énonçant le contournement des anti-FASII, notre laboratoire s'est investi dans l'étude d'adaptation aux anti-FASII chez *S. aureus*. Deux stratégies d'adaptation sont à ce jour issues de nos études. Nos résultats sont à rajouter aux précédentes études qui montrent que les mutations dans la cible (ici FabI) confèrent une résistance aux anti-FASII (222).

Dans nos études, deux modes d'adaptation aux anti-FASII sont établies.

La première s'agit d'une mutation au niveau du gène *fabD* (137) ou dans des gènes codants des sous-unités d'acc (115). Cette mutation d'un gène dans l'étape d'initiation de la voie FASII permet de favoriser l'entrée des acides gras exogènes et son intégration dans des phospholipides en utilisant la protéine ACP. Cette protéine s'accroche au précurseur et va ensuite permettre l'élongation des acides gras. Une mutation dans le gène *fabD* ne permet plus à l'ACP de rentrer dans le cycle de FASII. Dans ces conditions, il y a une quantité plus importante d'ACP libre disponible dans le cytoplasme qui serait disponible pour l'enzyme PlsX afin d'incorporer les acides gras exogènes. Il a aussi été montré que ce mutant reste pathogène chez le modèle murin montrant qu'une souche de *S. aureus* garde sa virulence malgré un profil d'acides gras exogènes. Nous avons pu montrer que l'anti-FASII AFN-1252, censé être plus efficace que le triclosan, ne permet pas d'éliminer cette bactérie (données non présentées).

En 2017 le laboratoire a aussi mis en avant qu'un nombre important de souches cliniques sont résistantes aux anti-FASII, et que certaines sont mêmes auxotrophes pour la synthèse des acides gras, leur rendant dépendant aux acides gras exogènes (271).

En 2018 (article N°2), nous avons pu déchiffrer un autre type d'adaptation. Il s'agit d'une adaptation sans mutation observée dans les gènes de la voie FASII. De plus, nous avons montré que les acides gras exogènes occupent les 2 positions des phospholipides, ce qui a toujours été décrit comme impossible due à la spécificité des réactions (136,146). Cette étude montre la capacité adaptive de *S. aureus*. Sa capacité d'adaptation aux anti-FASII semble définir une stratégie retrouvées aussi chez d'autres bactéries Firmicutes.

Toutes ces données mettent à mal l'utilisation des anti-FASII. Il semblerait, au vu de la facilité qu'ont les bactéries d'utiliser les acides gras exogènes, que l'utilisation de ces molécules en clinique porte de gros risques de résistance par adaptation.

Il y a cependant deux axes possibles d'utilisation des anti-FASII. Il serait peut-être possible d'envisager leur utilisation en synergie avec un autre antibiotique dans le but de créer un cocktail efficace.

Une bithérapie composée des anti-FASII (inhibant la synthèse endogène des acides gras) et à une autre molécule ciblant la prise des acides gras exogènes serait en théorie efficace.

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse offrent de nombreuses informations permettant de mieux comprendre l'adaptation de *S. aureus* aux anti-FASII, résumées brièvement ci-dessous.

- La paroi : lors de l'adaptation, les bactéries sont bloquées en division et forment des diplo- et tetra-coques. Un espace est visible entre le cytoplasme et la paroi. Une étude plus approfondie des images microscopiques montre que cet espace est lié à une baisse de la taille de la membrane cellulaire.

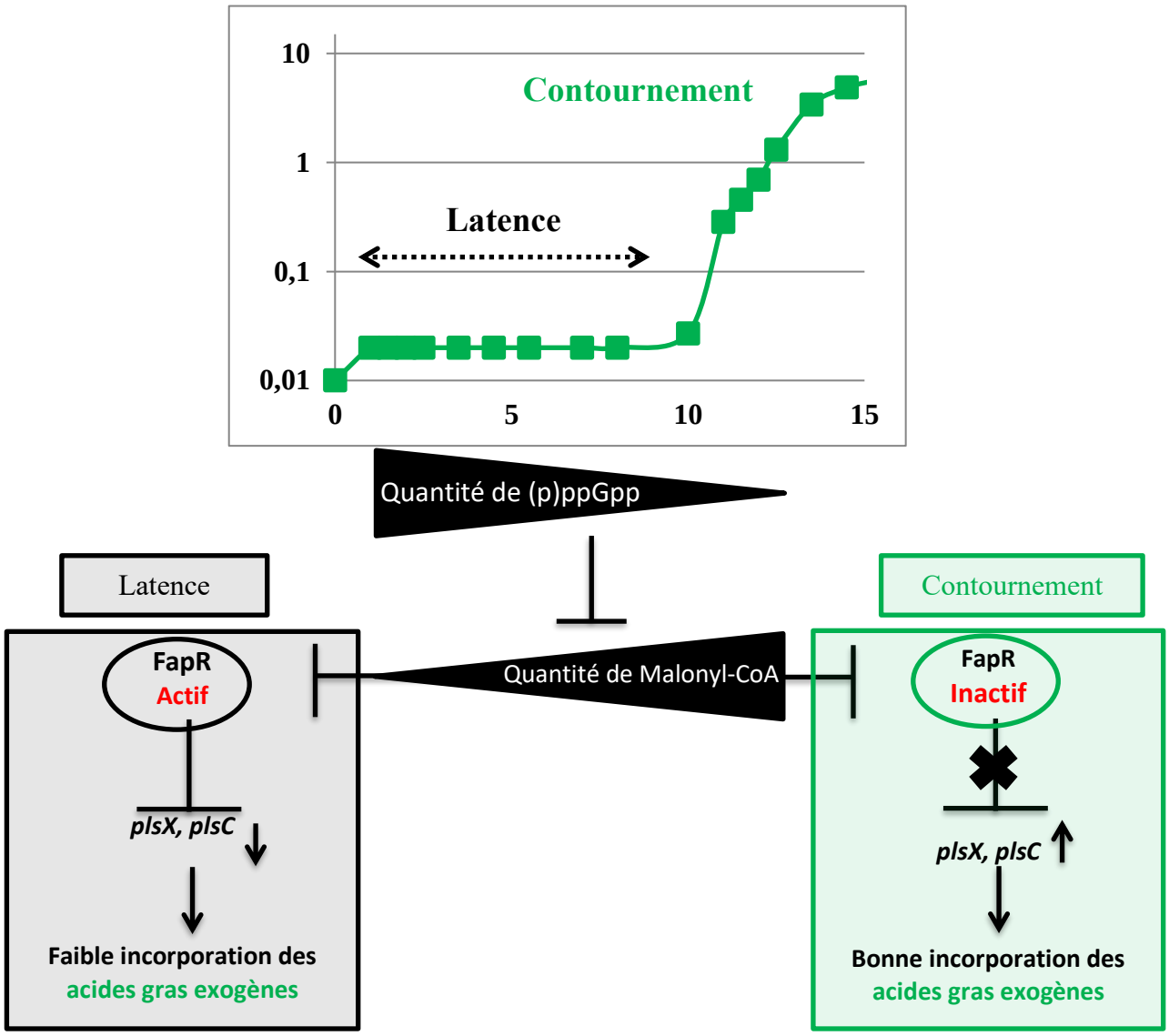
- La prise des acides gras exogènes dans la cellule ne semble pas être le facteur limitant. Cette conclusion est basée sur les évidences suivantes :
    a. Les deux substrats nécessaires pour l'incorporation des acides gras exogènes, l'ACP et les acides gras, sont disponibles pour *S. aureus* en présence du sérum.
    b. Les acides gras peuvent être utilisés dans les 2 positions des phospholipides même en absence d'une sélection antibiotique.
    c. Le mutant fabD n'a pas besoin de temps d'adaptation pour la prise des acides gras exogènes.

Il reste néanmoins de nombreuses questions à élucider comme le rôle de la réponse stringente dans cette adaptation. Plusieurs pistes peuvent être envisagées :

La protéomique sur toute la durée de l'adaptation va permettre de mieux comprendre les changements subis par *S. aureus* lors de la sortie de latence. A ce jour, la question se pose sur une régulation négative inhibant la division cellulaire (réponse stringente, étudiée par A. Pathania au laboratoire).

- Des résultats du laboratoire non encore publiés expliciteraient le rôle du (p)ppGpp durant l'adaptation. En effet, durant la phase d'adaptation, il semblerait y avoir une induction de (p)ppGpp au début, alors qu'à l'inverse il y a une diminution du malonyl-CoA. De plus, la prise des acides gras exogènes serait plus efficace lorsque le niveau

de (p)ppGpp est faible. A l'inverse, à la sortie de la phase d'adaptation le niveau de (p)ppGpp diminue alors que le malonyl-CoA augmente. Une piste serait donc que le (p)ppGpp et le malonyl-CoA sont des déterminants de la transition entre la phase de latence et la phase adaptée (voir figure ci-dessous réalisée par Amit Pathania).



- Les bactéries possédant les acides gras exogènes ne semblent pas avoir de problèmes particuliers par rapport aux cellules sauvages. Ces bactéries possèdent une membrane et une paroi a priori normale. Il pourrait être intéressant de savoir si une souche ne possédant pas de paroi, serait ou non sensible à ce changement d'acides gras dans la membrane. En effet Errington (272) a pu mettre en évidence une forme de cellule à Gram positive sans paroi. Afin de savoir si l'apparition de persisteurs de la forme L serait possible au cours de l'utilisation d'anti-FASII, il serait intéressant de tester ces souches avec des anti-FASII. Suivant les résultats, il sera conseillé de ne pas privilégier des molécules contre la paroi si la forme L apparaît chez les bactéries adaptées aux acides gras exogènes.

- Le problème de division cellulaire pourrait être lié au complexe XerC et FtsK. Ce complexe peut être une cible potentielle.
- Une expérience de timelapse avec des acides gras exogènes marqués fluorescents pourrait nous permettre de visualiser la prise des acides gras dans le temps. Ceci nous permettra de voir si la prise des acides gras exogènes est limitée à la sous population (3%) des clusters adaptés ou non.
- La cardiolipine joue un rôle dans la division cellulaire. Au niveau membranaire, une diminution de la cardiolipine pourrait être responsable d'une diminution de la division cellulaire même si chez *E. coli* les PG et les CL ne sont pas essentiels (273). Une étude de la cardiolipine et de la fluidité membranaire pourrait être faite. Cette étude permettrait de savoir si le temps d'adaptation observé ne serait pas simplement une adaptation à cette différence de fluidité.
- Des microorganismes comme les mycoplasmes et certains lactobacilles (274) ne disposent pas de système de synthèse des acides gras, et utilisent les acides gras exogènes (275). Il pourrait être intéressant de les étudier afin de voir si des similarités sur l'utilisation des acides gras exogène n'existe pas.
- A l'heure actuelle, il semble que la meilleure piste pour le blocage d'un mécanisme utilisé par la bactérie afin d'utiliser les acides gras exogènes, serait le blocage de l'enzyme FakA. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier *in vivo* chez le modèle murin un mutant FakA traité à l'anti-FASII AFN-1252. Cette expérience permettrait de valider cette cible le cas échéant, et nous donnerait ainsi la possibilité de proposer une bi-thérapie efficace.

Toutes ces données mises ensemble nous ont permis de proposer une hypothèse sur l'explication de cette période d'adaptation. Nous avons pu voir dans l'article N°1 qu'une mutation dans FabD permettrait une augmentation de la présence de la protéine ACP facilitant une meilleure prise des acides gras exogènes. Il est aussi possible que cette mutation entraîne une baisse de la quantité de malonyl-ACP. Comme discuté précédemment, cette molécule serait liée à la quantité de ppGpp chez *E. coli*. Une baisse du malony-ACP pourrait donc entraîner une diminution de la quantité de ppGpp laissant penser que la réponse stringente ne serait pas active chez le mutant FabD. Ceci, en corrélation avec nos résultats de protéomique, du mutant CodY et des résultats d'Amit Pathania sur la réponse stringente pendant la période d'adaptation pourrait expliquer que la réponse stringente serait responsable cette longue adaptation. A réponse stringente pourrait être le signal de réveil de cette dormance.

Pour résumer, ces travaux ont permis de mieux caractériser l'adaptation de *S. aureus* aux acides gras exogènes. Ils montrent que l'utilisation unique d'anti-FASII ne permet pas d'éradiquer *S. aureus* du fait de la prise des acides gras exogènes (et plus particluièrement dans les 2 positions des phospholipides). L'adaptation serait liée à la réponse stringente. Plusieurs questions restent en suspens comme la vérification qu'une souche où les voies FASII et Fak sont bloquées serait bien non pathogène *in vivo*.

ANNEXES

1) Des souches cliniques présentent une auxotrophie pour les acides gras exogènes

Cette revue permet de mettre en exergue l'utilisation des acides gras exogènes par plusieurs types bactériens gram positif comme les streptococci, enterococci et le groupe des staphylococci. Nous rappelons que ces bactéries peuvent prendre les acides gras exogènes présents en grande quantité chez l'hôte, et que l'utilisation des anti-FASII comme le triclosan largement utilisé jusqu'à présent n'est pas toujours efficace. La volonté de poursuivre l'utilisation des anti-FASII par la production de nouvelles molécules comme l'AFN1252, serait inefficace contre des bactéries présentant déjà une résistance aux anti-FASII, ce qui semble être le cas d'après l'étude de souches cliniques (271).

Biochimie

Volume 141, October 2017, Pages 40-46, © 2017 This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license

The *Staphylococcus aureus* FASII bypass escape route from FASII inhibitors

Claire Morvan[1], David Halpern, Gérald Kénanian, Amit Pathania, Jamila Anba-Mondoloni, Gilles Lamberet, Alexandra Gruss, Karine Gloux

https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.004Get rights and content

Abstract

Antimicrobials targeting the fatty acid synthesis (FASII) pathway are being developed as alternative treatments for bacterial infections. Emergence of resistance to FASII inhibitors was mainly considered as a consequence of mutations in the FASII target genes. However, an alternative and efficient anti-FASII resistance strategy, called here FASII bypass, was uncovered. Bacteria that bypass FASII incorporate exogenous fatty acids in membrane lipids, and thus dispense with the need for FASII. This strategy is used by numerous Gram-positive low GC % bacteria, including streptococci, enterococci, and staphylococci. Some bacteria repress FASII genes once fatty acids are available, and "constitutively" shift to FASII bypass. Others, such as the major pathogen *Staphylococcus aureus*, can undergo high frequency mutations that favor FASII bypass. This capacity is particularly relevant during infection, as the host supplies the fatty acids needed for bacteria to bypass FASII and thus become resistant to FASII inhibitors. Screenings for anti-FASII resistance in the presence of exogenous fatty acids confirmed that FASII bypass confers anti-FASII resistance among clinical and veterinary isolates. Polymorphisms in *S. aureus* FASII initiation enzymes favor FASII bypass, possibly by increasing availability of acyl-carrier protein, a required intermediate. Here we review FASII bypass and consequences in light of proposed uses of anti-FASII to treat infections, with a focus on FASII bypass in *S. aureus*.

1. Numerous Gram-positive bacteria can bypass the FASII pathway by using exogenous fatty acids

Steps of the FASII biosynthesis pathway have been extensively studied (see Refs. [1], [2], [3], [4] for in-depth reviews); "FASII bypass" is defined here as the capacity of numerous bacteria to use exogenous fatty acids, rather than *de novo* synthesis to constitute their membranes (schematized in Fig. 1; FASII bypass in green). At one extreme, *Lactobacillus bulgaricus* lacks a complete FASII pathway, and relies on exogenous fatty acids for growth [7]. Numerous food-fermenting bacteria and opportunist pathogens (*e.g.*, *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus agalactiae* respectively) efficiently incorporate fatty acids directly in membranes, and may thereby adapt their membrane phospholipid profiles to their lipid

environment [5], [8]. Interestingly, in *S. agalactiae* FASII gene expression is repressed in the presence of exogenous fatty acids and the profile of fatty acids incorporated into phospholipids mimics that of environmental fatty acids [5]. The existence of FASII bypass mechanisms makes sense: using full-length exogenous fatty acids directly for phospholipid synthesis economizes on energy expenditure during growth. Other pathogenic species, including enterococci, other streptococci, and staphylococci can use exogenous fatty acids to compensate a FASII block triggered by fatty acid repression or by a FASII inhibitor [5], [9], [10], [11], [12].

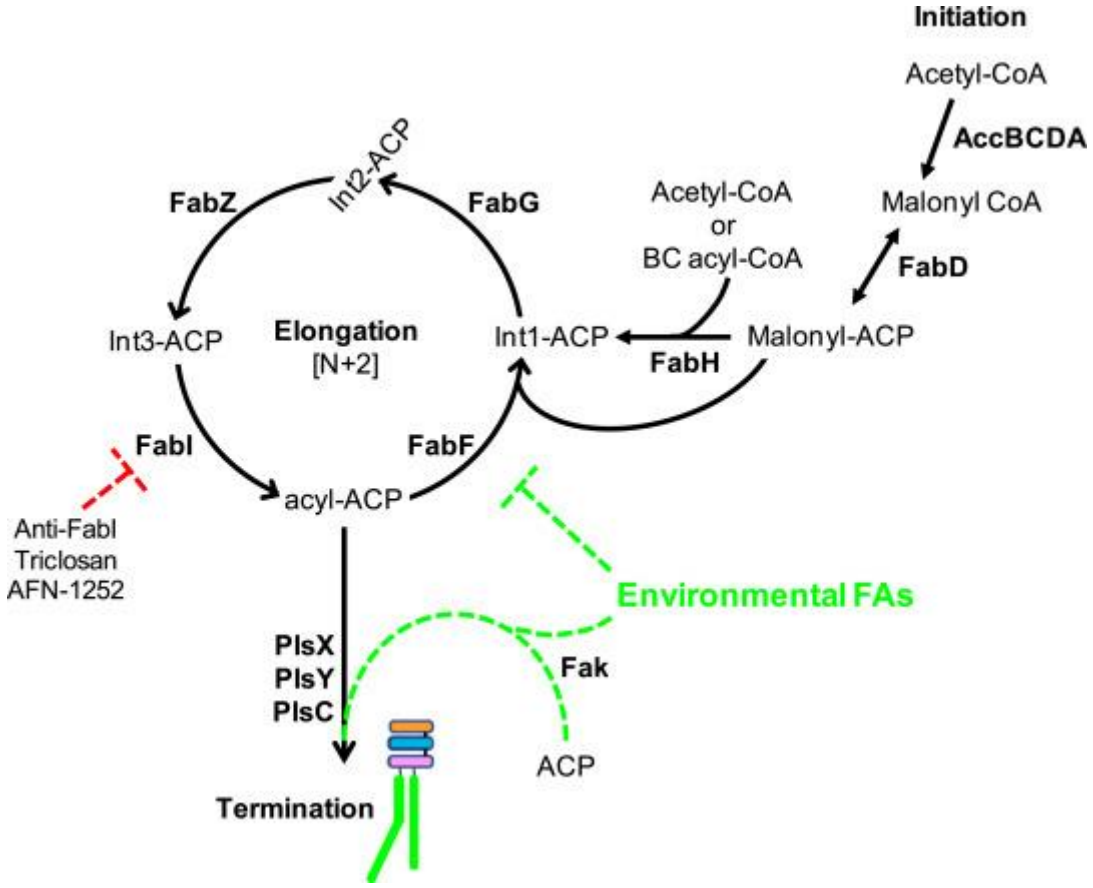


Fig. 1. FASII pathway and bypass. The FASII pathway comprises 3 main steps: i- initiation, during which a priming molecule (short chain fatty acid) is synthesized; ii- elongation, during which 4 enzymes elongate the fatty acid chain by two carbons per iterative cycle; and iii- termination, in which a mature length acyl moiety is driven towards phospholipid synthesis enzymes. The enzymes involved in each stage of FASII in *S. aureus* are indicated; Int1-ACP to Int3-ACP represent reaction intermediates. The major fatty acids produced by *S. aureus* have branched chains (BC). FASII is blocked by environmental fatty acids (FA; green dotted line), as occurs in the streptococci [5], and/or by FASII inhibitors (red dashed line). The FASII block favors the use of exogenous fatty acids (in green), leading to a change in the final phospholipid product (called FASII bypass). Steps of the FASII pathway have been extensively characterized by numerous laboratories (see Refs. [1], [2], [3], [4] for in-depth reviews). The schema presented here is based on Morvan et al., (Fig. S1, [6]).

2. Could FASII inhibitors be efficient antibiotics despite FASII bypass in Gram-positive bacteria?

2.1. Development of FASII inhibitors

A FASII inhibitor, isoniazid, has long been used to treat mycobacterial infections. Mycobacteria synthesize and require specific and very long chain fatty acids that cannot be supplied by the environment, explaining the effectiveness of such drugs [13]. The FASII pathway has more recently been a privileged "hot" target for antimicrobial development against the low GC percent Firmicutes. In various studies, strains of listeria, streptococci, staphylococci, and enterococci were reported to be inhibited by various anti-FASII [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23]. Most reported anti-FASII drugs (reviewed in Table 1) target FabB/F and FabI, which catalyze essential steps in the iterative FASII elongation cycle. It is notable that bacteria affected by FASII inhibitors may be limited to those expressing the targeted FASII enzyme. For instance, streptococci encode an enoyl reductase distinct from FabI, making them naturally resistant to anti-FabI antimicrobials. This feature may be useful when developing narrow range antibiotics, and concomitantly sparing non-pathogens present in the same ecosystem.

Table 1. Anti-FASII inhibitors.

Target	Enzyme function	Inhibitors	References
Fatty acid transfer			
AcpS	ACP synthase	Sch 538415, 4H-Oxazol-5-one, anthranilic acid	[24]
Initiation			
AccABCD	Acetyl-CoA Carboxylase	*Pyrrolidinediones* (Moiramide B), NCI 65828, andrimid, sulfonamidobenzamide (SABA) analogs	[24], [25], [26], [27]
FabD	Malonyl-CoA:ACP transacylase	Corytuberin	[24]
FabH	B-ketoacyl-ACP synthase III	HR12 (RWJ-3981), indole (SB418001) analogs, 1,2-Dithiole-3-ones, benzoylaminobenzoic acids, *platensin*, phomallenic acids, cyclic sulfones, alkyl-CoA-disulfides, pyrazin-triazole containing Schiff base	[27], [28], [29]
Elongation			
FabB/F	B-ketoacyl-ACP synthase I et II	Cerulenin, thiolactomycin (and analogs), thiotetromycin, BABX,	[18], [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [25],

Target	Enzyme function	Inhibitors	References
		phomallenic acids, fasamycines, *platensimycin* (and analogs)	
FabG	B-ketoacyl-ACP reductase	Polyphenols	[24]
FabA	B-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase	Allenic acids, 3-Decynoyl-NAC	[24]
FabZ	B-hydroxyacyl-ACP dehydratase	NAS-91, NAS-21	[24]
FabI	Enoyl-ACP reductase I	Isoniazid [a], ethionamid [a], prothionamid [a], triclosan [b], pyrrolyl benzohydrazides, ene-amides with *azetidines*, diphenyl ether analogs, diazoborine, *aminopyridines, AFN-1252 (Debio-1452), Debio-1450, MUT-056399, CG-400549*, CG-02390, complestatin, neuropectine A, aquastatin A, chloropeptin I, 1 and 4 substituted imidazols, naphtyridinones, thiopyridines (GGTC-004061), vinaxanthone, cephalochromin, kalimantacin, batumin, flavonoïds (*e.g*. EGCG), meleagrin	[17], [24], [27], [29], [30], [31], [32], [33], [34]
FabK	Enoyl-ACP reductase II	*Aminopyridines,* Atromentin, Leucomelone, AG205	[24]

a Used to treat *M. tuberculosis* infections.

b Used as broad spectrum biocide; italics, molecules tested on animal models against *S. aureus* infections, of which Debio-1450, Debio-1452, and CG-400549 are in clinical trials. Completed from Zhang et al. 2006 [24] and Parsons et al. 2011 [27]. References not cited in those articles are presented at right.

The first, and by far most widely used anti-FASII is triclosan, which has been extensively employed as a biocide, *e.g.*, in hygiene, household, and hospital products [35], [36]. At low concentrations, triclosan targets FabI [37]. However, at higher concentrations (*e.g.*, 0.2–1 % in soaps, creams, surgical sutures), triclosan provokes membrane permeability and generalized non-

specific membrane damage [38] and was linked to host-related damage (leading to its recent removal from hygiene and cosmetic products), and to widespread resistance (see section 3.) [39], [40]. These unwanted properties stimulated the development of new FabI inhibitors with higher specificity, which eliminate triclosan-related side effects [17], [21], [41], [42], [43]. At least one such drug, AFN-1252 (renamed Debio 1452), is currently in clinical trials for treatment of *S. aureus* infections ([43] see 3.4.2.).

2.2. Limitations of FASII inhibitors due to FASII bypass

Some bacteria use fatty acids, which are abundant in the host, to bypass a block in FASII synthesis. As a formal proof, a *S. agalactiae* strain deleted for its FASII biosynthesis genes was shown to retain full virulence [5]. As a second example, an *E. faecalis* fatty acid auxotroph was identified as the agent responsible for an umbilical cord infection [44]. These results essentially ruled out the use of anti-FASII to treat infections due to streptococci and enterococci, while the status of staphylococci was still debated.

3. The case of *S. aureus* and FASII inhibitors

Until recently, clinical *S. aureus* resistance to FASII inhibitors was mainly attributed to compensatory mutations in their target enzymes. A brief summary of this clinically significant class of anti-FASII resistance is given prior to consideration of the FASII bypass strategy.

3.1. *S. aureus* anti-FASII resistance by modifications of the antimicrobial target

Documented cases of resistance to the widely used biocide triclosan mapped to point mutations in the *fabI* gene or its promoter [40], [41], [45]. FabI mutations were also selected in the presence of other FabI inhibitors, AFN-1252 and MUT056399 [17], [46]. Interestingly, *S. aureus* triclosan resistance was discovered in several cases to be associated with horizontal transfer of a *fabI* allele from *S. haemolyticus* (sh-*fabI*) [40], [45], [47]. The presence of sh-*fabI* was subsequently found to be frequent among triclosan-resistant clinical isolates [40], [47]. Interestingly, resistance to FabF inhibitors was found to be associated with mutations in FabH, possibly by increasing availability of malonyl-ACP, a substrate shared by FabF and FabH [48].

3.2. *S. aureus* anti-FASII resistance by FASII bypass

The role of *S. aureus* FASII bypass in response to FASII inhibition has been a point of controversy [5], [9], [11], [15], [49], [50], [51]. Biochemical studies led to the belief that the main fatty acid synthesized by *S. aureus*, anteiso C15:0 (*ai*15), was indispensable for phospholipid synthesis and membrane fluidity [11], [49], [50]. Moreover, PlsC, the enzyme that mediates fatty acid incorporation at position 2 of the glycerophosphate backbone is reportedly highly specific [11], [41], [50]. The first *S. aureus* mutations shown to confer FASII bypass led to fatty acid auxotrophy and mapped *accC* and *accD*, encoding acetyl-CoA carboxylase subunits involved in

FASII initiation [11]. An *acc* mutant grew poorly in the absence of *ai*15, and was noninfectious in a mouse model, leading authors to suggest that emergence of FASII bypass variants during treatment would not compromise anti-FASII efficacy [50].

However, the capacity of *S. aureus* to incorporate exogenous fatty acids as a means of adapting to a FASII block turned out to be more common than reported. Our studies revealed that fatty acid supplementation favored high frequency mutations leading to FASII bypass and anti-FASII resistance (10^{-6} compared to 10^{-8} in the absence of fatty acids) [6]. A robust class of FASII bypass mutants mapped to another initiation enzyme, FabD (malonyl-CoA:ACP transacylase). Some *fabD* mutants displayed a gain of function phenotype, contrasting to previously identified *acc* auxotrophs. The strains are mutated in the active siteof FabD and are able to synthesize their own fatty acids, yet they also grow well by incorporating different combinations of exogenous fatty acids when FASII is blocked by either triclosan (Fig. 2) or AFN-1252 [6]. One *fabD* mutation may have resulted from replication slippage [52] in a run of "A" repeats, conferring triclosan resistance that might readily "slip back" to restore a wild type phenotype when selection is lifted (data not shown). A FASII bypass event can also be generated by anti-FabF treatment [6]. As mentioned above, a FabF inhibitor led to mutations in FabH, a third enzyme needed for FASII initiation. Interestingly, poor growth of these strains was rescued by exogenous fatty acid addition [48].

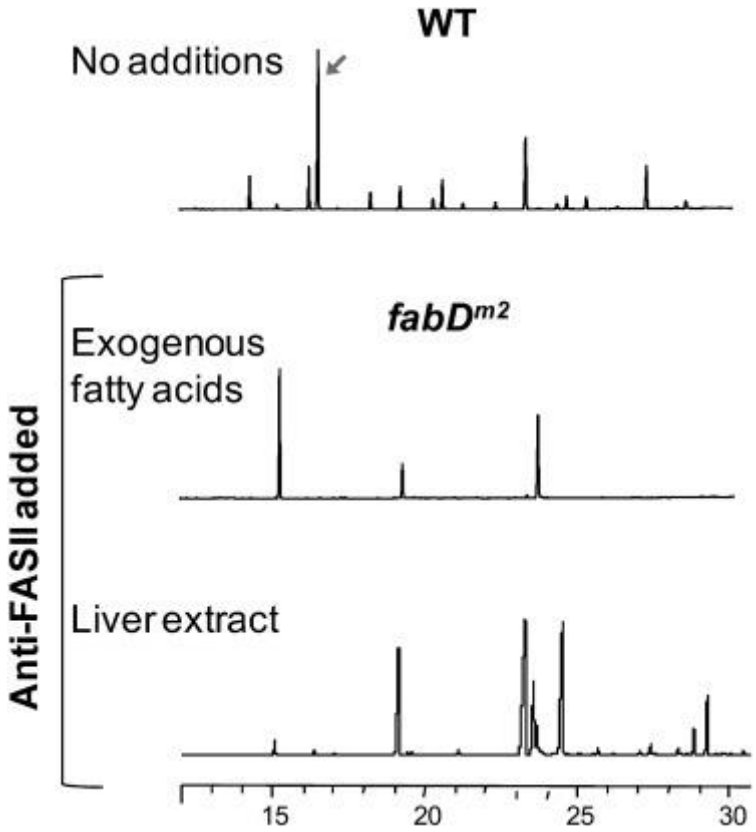


Fig. 2. FASII bypass occurs with different fatty acid cocktails. Fatty acid profiles are shown for the following strains and conditions: Top, *S. aureus* Newman strain grown in BHI medium. The diagonal arrow indicates the position of *ai*15, the major fatty acid synthesized by *S. aureus*. Center, a *fabD*^{m2} mutant corresponds to "Dep-5", which depends on exogenous fatty acids for normal growth [6]. It is grown in BHI medium containing triclosan and three exogenous fatty acids, C14:0, C16:0, and C18:1. Bottom, the *fabD*^{m2} mutant is grown in 3 % liver extract as fatty acid

source. The fatty acid profile of this mutant is equivalent to that of the liver extract. Data in this figure correspond to gas chromatography results from Morvan et al. [6].

Selective pressure by FASII inhibitors thus leads to resistant *S. aureus* that use different fatty acid combinations to comprise their membranes. Membrane composition is therefore not stringently controlled, an observation that also extends to clinical strains [47].

3.3. A model for FASII bypass in *S. aureus*

Recently elucidated steps of FASII bypass in *S. aureus* led to the following model (Fig. 3). The first step in exogenous fatty acid incorporation is phosphorylation by fatty acid kinasecomplex FakA FakB1 FakB2 (to acyl-PO_4) [49]. Phosphorylated fatty acids are substrates for PlsY, which attaches an acyl group to position 1 of the glycerol-phosphate backbone [1]. A FASII block changes the balance of metabolic intermediates, and accumulation of malonyl-ACP. However, certain FabD variants produce less malonyl-ACP, leaving more free ACP available. This leads to a key step in the model, in which PlsX, the enzyme that converts acyl-ACP to acyl-PO_4, reverses its directionality. Acyl-ACPs may then be elongated by FASII (if it is not blocked) or used to complete phospholipid synthesis by PlsC, which transfers acyl-ACP to glycerol phosphate at position 2 to form phosphatidic acid [11]. We provided direct evidence for this FASII bypass model in *S. aureus* isolates carrying $FabD^{196}$polymorphisms, in which phospholipids comprise exclusively exogenous fatty acids when FASII is blocked [6]. Differential regulation of FASII bypass in *S. aureus* versus other Gram-positive bacteria (that directly utilize exogenous fatty acids in all tested conditions) is being investigated.

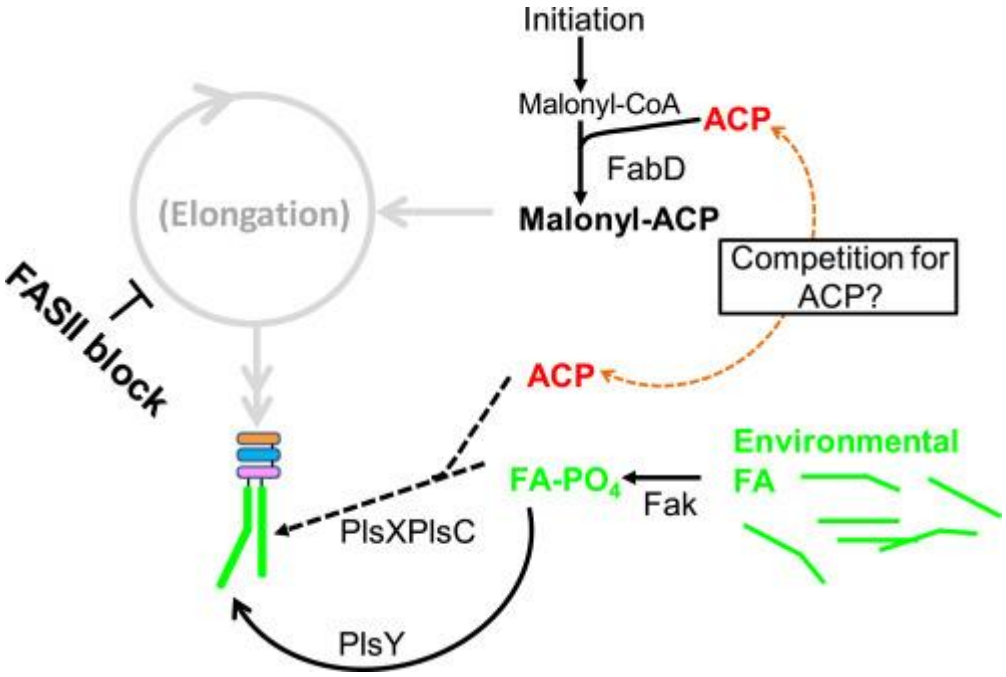


Fig. 3. **Model for FASII bypass in *S. aureus fabD* mutants and natural variants**. FASII and fatty acid incorporation kinase (Fak) dependent pathways are as previously identified [1], [53]. Fatty acids (FA) are ubiquitous in host environments. Exogenous fatty acids are substrate for the kinase complex FakA FakB1 FakB2 to produce phosphorylated fatty acids (FA-PO_4), which are substrates for PlsY; this drives incorporation of an exogenous fatty acid into position 1 of the glycerolphosphate backbone [1], [53]. FASII inhibitors that block elongation (in gray), lead to malonyl-ACP

accumulation. Less efficient FabD activity of certain *fabD* variants leaves more free ACP [6], that can be used by PlsX to convert exogenous fatty acids (green) into phospholipids. This "reverse" PlsX activity drives exogenous fatty acid incorporation into the glycerolphosphate backbone. As a consequence, exogenous fatty acids fill both positions of the glycerolphosphate phospholipid backbone. The diagram is derived from Morvan et al. [6].

3.4. Anti FASII efficiency on *S. aureus in vivo*: What's the verdict?

i. 3.4.1. Difficulties in comparing *in vivo* models

Numerous animal experiments examined the efficacy of experimental FASII inhibitors (mainly anti-FabI) against *S. aureus* infections [17], [30], [42], [43], [54], [55], [56], [57]. However, protocols varied between studies, *e.g.*, infection regime, bacterial inocula, drug concentrations compared to MIC (minimal inhibitory concentration), drug treatment regimens post-infection, and evaluation of inhibitor efficiency (summarized in Supplementary Tables 1 and 2). The non-uniformity of test systems poses a main problem for gaining a real assessment of drug efficacies. Furthermore, current methods used to detect surviving *S. aureus* following anti-FASII treatments may fail to screen for fatty acid auxotrophs.

ii. 3.4.2. The case in favor of anti-FASII inhibitors

i- Tests in animal models gave positive results on the efficacy of anti-FASII drugs in treating *S. aureus* infections [17], [20], [56]. ii- Clinical trials using AFN-1252 reported promising results in reducing lesion size of *S. aureus* skin infections (Clinicaltrials.gov identifier: NCT02426918) [43]. These reports concluded on the effectiveness of the tested FASII inhibitors. iii- Numerous bacteria (and also humans) lack a FabI enzyme. A narrow spectrum antimicrobial is a desired characteristic, which allows infections to be treated with minimal detrimental effects on the host and its harmless microbiomes. The anti-FabI Debio 1452 was shown to have low impact on the main intestinal bacterial populations, thus making the oral drug route a possible option [58].

iii. 3.4.3. The case against FASII inhibitors

i- Triclosan (anti-FabI) treatment was found to be associated with an increase in *S. aureus*colonization [59]. ii- *In vitro*-isolated *fabD* variants were shown to be infectious, and arose in response to different anti-FASII drugs [6]. iii- In 6 cases, anti-FASII-resistance status of clinical isolates was correlated to the presence of *fabD* polymorphisms that favor FASII bypass [47], [6]. iv- A screening involving 700 clinical isolates revealed that 19 % were triclosan-resistant, among which 1/3 were revealed only when fatty acids were present in screening medium [47]. v- Clinical fatty acid auxotrophs, which have a fatty acid growth requirement, were isolated in 2 out of 103 patient samples [47], and were also reported in a patient with septic arthritis [60].

So what is the verdict on anti-FASII? There is evidence that these drugs are active against *S. aureus* in certain cases. Yet, after anti-FASII treatment, resistant bacteria might persist and not be detected in the short term. The presence of FASII bypass variants in human and farm animal isolates raise questions on their efficient detection and on the long-term efficacy of FASII inhibitors in treating infections.

3.5. Cross resistance of FASII bypass strains

FASII bypass isolates are expectedly cross-resistant to all antimicrobials targeting FASII enzymes. Indeed, in *S. aureus*, triclosan-selected FASII bypass variants were resistant to AFN-1252, the FabI inhibitor in clinical trials, and platensimycin, a FabF inhibitor and antimicrobial candidate [22], [43], [6]. Clinical and laboratory strains bearing the same FabD polymorphism ($FabD^{196}$) were both triclosan and AFN-1252 resistant in medium containing fatty acids ([6], Fig. 4), and grew at concentrations of >500 fold the AFN-1252 MIC ([11] and data not shown). Thus, in addition to their frequent occurrence in clinical, veterinary, and laboratory settings, fatty acid auxotrophs and isolates that bypass FASII are all expectedly multi-anti-FASII-resistant.

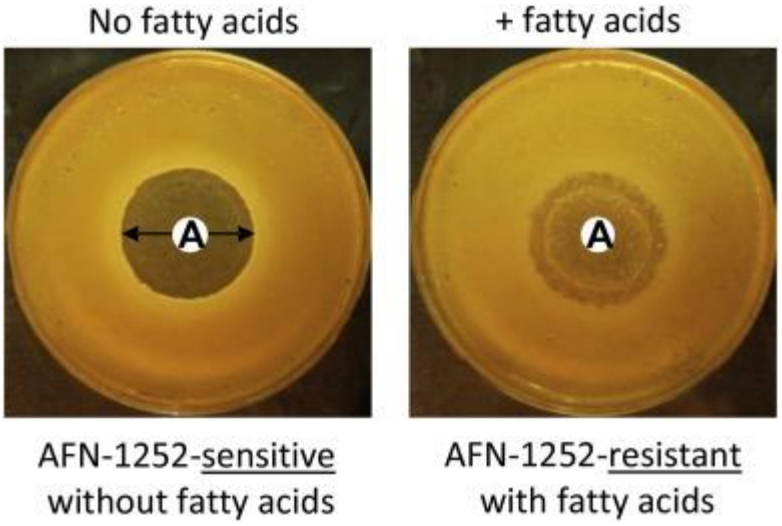


Fig. 4. **Fatty acids favor *S. aureus* resistance to anti-FASII AFN-1252**. Left, medium does not contain fatty acids; right, medium is supplemented with fatty acids. Both plates are overlaid with clinical *S. aureus*strain SA40 [61], which harbors a natural *fabD* variant correlating with resistance to FASII inhibitors [6]. AFN-1252 (1 µg) is deposited in the center of each plate. The dark halo (delineated by arrows, left plate) indicates growth inhibition by AFN-1252. This *S. aureus* isolate is AFN-1252- resistant when fatty acids are present (right plate). This strain is also triclosan-resistant in fatty-acid-supplemented medium [6]. Plates are photographed 36 h post- incubation at 37 °C.

We screened *S. aureus* wild type and FASII bypass *fabD* mutants for altered sensitivities to antibiotics having targets unrelated to FASII (Table 2). In conditions where bacteria relied on exogenous fatty acids, *fabD* mutants showed increased tolerance to fosfomycin (inhibitor of cell wall synthesis enzyme MurA) and trimethoprim (inhibitor of dihydrofolate reductase). Changes in phospholipids due to altered fatty acids by FASII bypass may thus impact overall membrane composition and bacterial behavior including antibiotic resistance.

Table 2. MICs of fosfomycin and trimethoprim in *S. aureus* Newman wild type and FASII bypass mutant strains.

Strain	Fosfomycin			Trimethoprim		
	BHI	FA	FA-T	BHI	FA	FA-T
Newman	12	2	–	4	1.7	–
fabD^{m1*}	8	4	64	2	1.5	>32
fabD^{m2**}	–	128	96	–	>32	>32

Antibiotic minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using Etests (BioMerieux; expressed as µg antibiotic/ml). MIC test ranges are 0.064–1024 µg/ml for fosfomycin and 0.002–32 µg/ml for trimethoprim. Strips were placed on BHI medium, or BHI medium containing fatty acids (FA, 0.5 mM), and fatty acids plus the FASII inhibitor triclosan (0.25 µg/ml, called FA-T). -, strain does not grow in test condition.

*$fabD^{m1}$ corresponds to "Cond-17" a mutant that can synthesize fatty acids, but that uses FASII bypass in the presence of FASII inhibitors [6].

**$fabD^{m2}$ requires exogenous fatty acids for growth [6].

4. Conclusions

Numerous Firmicutes including pathogens, incorporate exogenous fatty acids, which can compensate a FASII inhibition. The FASII pathway can be inhibited in some bacteria, simply by exogenous fatty acid supplementation, or in others, with further addition of FASII inhibitors. In *S. aureus*, the essentiality of the major endogenous fatty acid *ai*15 has been in debate. However, the finding that mutants arising at high frequencies can replace endogenous fatty acid species with varied combinations of exogenous fatty acids casts doubts on this dogma. Thus staphylococci, like other Firmicutes, may have a higher membrane flexibility than previously recognized.

The animal environment is rich in fatty acids, making it the ideal natural selection medium for FASII bypass. *S. aureus* isolates that bypass FASII inhibition are already present among clinical and veterinary isolates, likely as a consequence of the widespread use of triclosan. We suggest that FASII bypass is one main strategy by which *S. aureus* overcomes FASII inhibitors in animals. Experiments on animals and humans have supported the use of anti-FASII to treat *S. aureus* infections. However, altered behavior of FASII bypass strains, such as small colony variant formation [60] and antibiotic resistance, may lead to cross resistance, bacterial persistence and chronic disease.

In view of these studies, we underline the need to conduct follow-up screenings prior to validating novel anti-FASII antimicrobials for treatment. Screenings for FASII bypass variants should be performed in conditions closer to those found *in vivo*, *i.e.*, that include fatty acids in assays [47]. FASII bypass variants that emerge after anti-FASII therapy may deserve further investigation to assess the risk of recurrence and chronic infection.

Note

In their contribution to this issue, Yao and Rock raised the possibility that human staphylococcal isolates we identified as FASII bypass variants, including auxotrophs, might have emerged in the laboratory. This interpretation does not fit with the screening (not selection) approach used in our study. Authors should note that fatty-acid-containing host reservoirs of *S. aureus* are natural

selection sites for resistance via FASII bypass; our findings uncover an emergence strategy that adds to the current risk of antibiotic resistance.

Acknowledgements

We thank all the members of the MicrobAdapt team for numerous stimulating discussions on FASII bypass. Research presented in this review received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) FattyBact project 525 ANR-132101. CM and GK were awarded stipends from the French Research Ministry. AP received a postdoctoral fellowship from the DIM-Malinf program, Conseil Régional Île de France (www.dim-malinf.org).

[1] Y.M. Zhang, C.O. Rock**Membrane lipid homeostasis in bacteria** Nat. Rev. Microbiol., 6 (2008), pp. 222-233

[2] J. Beld, D.J. Lee, M.D. Burkart**Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering** Mol. Biosyst., 11 (2015), pp. 38-59

[3] J.B. Parsons, C.O. Rock**Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis** Prog. Lipid Res., 52 (2013), pp. 249-276

[4] R. Heath, S. Jackowski, C.O. Rock**Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes** D.E. Vance, J.E. Vance (Eds.), Biochemistry of Lipids. Lipoproteins and Membranes (fourth ed.) (2002)

[5] S. Brinster, G. Lamberet, B. Staels, P. Trieu-Cuot, A. Gruss, C. Poyart**Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens** Nature, 458 (2009), pp. 83-86

[6]C. Morvan, D. Halpern, G. Kénanian, C. Hays, J. Anba-Mondoloni, S. Brinster, S. Kennedy, P. Trieu-Cuot, C. Poyart, G. Lamberet, K. Gloux, A. Gruss **Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials** Nat. Commun., 7 (2016), p. 12944

[7] A. Fernandez, J. Ogawa, S. Penaud, S. Boudebbouze, D. Ehrlich, M. van de uchte, E. Maguin **Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*** Proteomics, 8 (2008), pp. 3154-3163

[8] Y. Yamamoto, V. Pargade, G. Lamberet, P. Gaudu, F. Thomas, J. Texereau, A. Gruss, P. Trieu-Cuot, C.Poyart **The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence** Mol. Microbiol., 62 (2006), pp. 772-785

[9] S. Brinster, G. Lamberet, B. Staels, P. Trieu-Cuot, A. Gruss, C. Poyart **Brief Communication Arising Replying to: W. Balemans et al** Nature, 462 (2009), 10.1038/nature08667 Nature 463(2010)

[10] A.K. Diederich, K.A. Duda, F. Romero-Saavedra, R. Engel, O. Holst, J. Huebner **Deletion of *fabN* in *Enterococcus faecalis* results in unsaturated fatty acid auxotrophy and decreased release of inflammatory cytokines** Innate Immun., 22 (2016), pp. 284-293

[11] J.B. Parsons, M.W. Frank, C. Subramanian, P. Saenkham, C.O. Rock **Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108 (2011), pp. 15378-15383

[12] L. Zhu, H. Bi, J. Ma, Z. Hu, W. Zhang, J.E. Cronan, H. Wang **The two functional enoyl-acyl carrier protein reductases of *Enterococcus faecalis* do not mediate triclosan resistance** mBio, 4 (2013), pp. e00613-00613

[13] A. Banerjee, E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K.S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, W.R. Jacobs Jr. ***inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*** Science, 263 (1994), pp. 227-230

[14] T.P. Soares da Costa, J.D. Nanson, J.K. Forwood **Structural characterisation of the fatty acid**

biosynthesis enzyme FabF from the pathogen *Listeria monocytogenes* Sci. Rep., 7 (2017), p. 39277
[15] J. Yao, C.O. Rock**How bacterial pathogens eat host lipids: implications for the development of fatty acid synthesis therapeutics** J. Biol. Chem., 290 (2015), pp. 5940-5946
[16] M.A. Banevicius, N. Kaplan, B. Hafkin, D.P. Nicolau **Pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of novel FabI inhibitor AFN-1252 against MSSA and MRSA in the murine thigh infection model** J. Chemother., 25 (2013), pp. 26-31
[17]S. Escaich, L. Prouvensier, M. Saccomani, L. Durant, M. Oxoby, V. Gerusz, F. Moreau, V. Vongso uthi, K.Maher, I. Morrissey, C. Soulama-Mouze **The MUT056399 inhibitor of FabI is a new antistaphylococcal compound** Antimicrob. Agents Chemother., 55 (2011), pp. 4692-4697
[18] Z. Feng, D. Chakraborty, S.B. Dewell, B.V. Reddy, S.F. Brady **Environmental DNA-encoded antibiotics fasamycins A and B inhibit FabF in type II fatty acid biosynthesis** J. Am. Chem. Soc., 134 (2012), pp. 2981-2987
[19] D.T. Moir, T.J. Opperman, M.M. Butler, T.L. Bowlin **New classes of antibiotics** Curr. Opin. Pharmacol., 12 (2012), pp. 535-544
[20] H.S. Park, Y.M. Yoon, S.J. Jung, C.M. Kim, J.M. Kim, J.H. Kwak **Antistaphylococcal activities of CG400549, a new bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) inhibitor** J. Antimicrob. Chemother., 60 (2007), pp. 568-574
[21]J. Schiebel, A. Chang, S. Shah, Y. Lu, L. Liu, P. Pan, M.W. Hirschbeck, M. Tareilus, S. Eltschkner, W. Yu, J.E. Cummings, S.E. Knudson, G.R. Bommineni, S.G. Walker, R.A. Slayden, C.A. Sotriffer, P.J. Tonge, C.Kisker **Rational design of broad spectrum antibacterial activity based on a clinically relevant enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase inhibitor** J. Biol. Chem., 289 (2014), pp. 15987-16005
[22] X.L. Wang, Y.B. Zhang, J.F. Tang, Y.S. Yang, R.Q. Chen, F. Zhang, H.L. Zhu **Design, synthesis and antibacterial activities of vanillic acylhydrazone derivatives as potential beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors** Eur. J. Med. Chem., 57 (2012), pp. 373-382
[23] J. Yao, M.E. Ericson, M.W. Frank, C.O. Rock **Enoyl-acyl carrier protein reductase I (FabI) is essential for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*** Infect. Immun., 84 (2016), pp. 3597-3607
[24] Y.M. Zhang, S.W. White, C.O. Rock **Inhibiting bacterial fatty acid synthesis** J. Biol. Chem., 281 (2006), pp. 17541-17544
[25]C. Freiberg, J. Pohlmann, P.G. Nell, R. Endermann, J. Schuhmacher, B. Newton, M. Otteneder, T .Lampe, D. Habich, K. Ziegelbauer **Novel bacterial acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors with antibiotic efficacy *in vivo*** Antimicrob. Agents Chemother., 50 (2006), pp. 2707-2712
[26]J. Wallace, N.O. Bowlin, D.M. Mills, P. Saenkham, S.M. Kwasny, T.J. Opperman, J.D. Williams, C. O.Rock, T.L. Bowlin, D.T. Moir **Discovery of bacterial fatty acid synthase type II inhibitors using a novel cellular bioluminescent reporter assay** Antimicrob. Agents Chemother., 59 (2015), pp. 5775-5787
[27] J.B. Parsons, C.O. Rock **Is bacterial fatty acid synthesis a valid target for antibacterial drug discovery?** Curr. Opin. Microbiol., 14 (2011), pp. 544-549
[28] F. Zhang, Q. Wen, S.F. Wang, B. Shahla Karim, Y.S. Yang, J.J. Liu, W.M. Zhang, H.L. Zhu **Design, synthesis and antibacterial activities of 5-(pyrazin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol derivatives containing Schiff base formation as FabH inhibitory** Bioorg. Med. Chem. Lett., 24 (2014), pp. 90-95
[29] H.T. Wright, K.A. Reynolds **Antibacterial targets in fatty acid biosynthesis** Curr. Opin. Microbiol., 10 (2007), pp. 447-453
[30]M. Takhi, K. Sreenivas, C.K. Reddy, M. Munikumar, K. Praveena, P. Sudheer, B.N. Rao, G. Rama kanth, J. Sivaranjani, S. Mulik, Y.R. Reddy, K. Narasimha

Rao, R. Pallavi, A. Lakshminarasimhan, S.K.Panigrahi, T. Antony, I. Abdullah, Y.K. Lee, M. Ramachandra, R. Yusof, N.A. Rahman, H. Subramanya **Discovery of azetidine based ene-amides as potent bacterial enoyl ACP reductase (FabI) inhibitors** Eur. J. Med. Chem., 84 (2014), pp. 382-394
[31] C.J. Zheng, M.J. Sohn, S. Lee, W.G. Kim **Meleagrin, a new FabI inhibitor from Penicillium chryosogenum with at least one additional mode of action** PloS One, 8 (2013), Article e78922
[32]L.L. Ling, J. Xian, S. Ali, B. Geng, J. Fan, D.M. Mills, A.C. Arvanites, H. Orgueira, M.A. Ashwell, G. Carmel, Y. Xiang, D.T. Moir **Identification and characterization of inhibitors of bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase** Antimicrob. Agents Chemother., 48 (2004), pp. 1541-1547
[33] R.K. Flamm, P. Rhomberg, N. Kaplan, R.N. Jones, D.J. Farrell **Activity of Debio1452, a FabI inhibitor with potent activity against *S. aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp., including multidrug-resistant strains** Antimicrob. Agents Chemother., 59 (5) (2015), pp. 2583-2587
[34] Y.J. Kwon, H.J. Kim, W.G. Kim **Complestatin exerts antibacterial activity by the inhibition of fatty acid synthesis** Biol. Pharm. Bull., 38 (2015), pp. 715-721
[35] A. Dann, A. Hontela **Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action** J. Appl. Toxicol., 31 (2011), pp. 285-311
[36] E. Ortega Morente, M.A. Fernandez-Fuentes, M.J. Grande Burgos, H. Abriouel, R. Perez Pulido, A.Galvez **Biocide tolerance in bacteria** Int. J. Food Microbiol., 162 (2013), pp. 13-25
[37] L.M. McMurry, M. Oethinger, S.B. Levy **Triclosan targets lipid synthesis** Nature, 394 (1998), pp. 531-532
[38] A.J. McBain, R.G. Ledder, L.E. Moore, C.E. Catrenich, P. Gilbert **Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility** Appl. Environ. Microbiol., 70 (2004), pp. 3449-3456
[39] N.P. Brenwald, A.P. Fraise **Triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)** J. Hosp. Infect., 55 (2003), pp. 141-144
[40]M.L. Ciusa, L. Furi, D. Knight, F. Decorosi, M. Fondi, C. Raggi, J.R. Coelho, L. Aragones, L. Moce, P.Visa, A.T. Freitas, L. Baldassarri, R. Fani, C. Viti, G. Orefici, J.L. Martinez, I. Morrissey, M.R. Oggioni **A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*** Int. J. Antimicrob. Agents, 40 (2012), pp. 210-220
[41] J. Schiebel, A. Chang, H. Lu, M.V. Baxter, P.J. Tonge, C. Kisker ***Staphylococcus aureus* FabI: inhibition, substrate recognition, and potential implications for *in vivo* essentiality** Structure, 20 (2012), pp. 802-813
[42] W. Balemans, N. Lounis, R. Gilissen, J. Guillemont, K. Simmen, K. Andries, A. Koul **Essentiality of FASII pathway for *Staphylococcus aureus*** Nature, 463 (2010) E3; discussion E4
[43] B. Hafkin, N. Kaplan, B. Murphy **Efficacy and safety of AFN-1252, the first *Staphylococcus*-specific antibacterial agent, in the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections, including those in patients with significant comorbidities** Antimicrob. Agents Chemother., 60 (2016), pp. 1695-1701
[44]N. Kubota, K. Kuzumoto, E. Hidaka, K. Yoshizawa, K. Yumoto, K. Oana, Y. Ogiso, T. Nakamura, Y. Kawakami **First isolation of oleate-dependent *Enterococcus faecalis* small-colony variants from the umbilical exudate of a paediatric patient with omphalitis** J. Med. Microbiol., 62 (2013), pp. 1883-1890
[45] L. Furi, R. Haigh, Z.J. Al Jabri, I. Morrissey, H.Y. Ou, R. Leon-ampedro, J.L. Martinez, T.M. Coque, M.R.Oggioni **Dissemination of novel antimicrobial resistance mechanisms through the insertion sequence mediated spread of metabolic genes** Front. Microbiol., 7 (2016), p. 1008
[46]J. Yao, J.B. Maxwell, C.O. Rock **Resistance to AFN-1252 arises from missense mutations**

in *Staphylococcus aureus* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) J. Biol. Chem., 288 (51) (2013), pp. 36261-36271
[47] K. Gloux, M. Guillemet, C. Soler, C. Morvan, D. Halpern, C. Pourcel, H. Vu Thien, G. Lamberet, A. Gruss **Clinical relevance of FASII bypass in *Staphylococcus aureus*** Antimicrob. Agents Chemother., 61 (2017), pp. e02515-e02516
[48] J.B. Parsons, J. Yao, M.W. Frank, C.O. Rock **FabH mutations confer resistance to FabF-directed antibiotics in *Staphylococcus aureus*** Antimicrob. Agents Chemother., 59 (2015), pp. 849-858
[49]J.B. Parsons, T.C. Broussard, J.L. Bose, J.W. Rosch, P. Jackson, C. Subramanian, C.O. Rock **Identification of a two-component fatty acid kinase responsible for host fatty acid incorporation by *Staphylococcus aureus*** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 111 (2014), pp. 10532-10537
[50] J.B. Parsons, M.W. Frank, J.W. Rosch, C.O. Rock ***Staphylococcus aureus* fatty acid auxotrophs do not proliferate in mice** Antimicrob. Agents Chemother., 57 (2013), pp. 5729-5732
[51] J.E. Cronan **A new pathway of exogenous fatty acid incorporation proceeds by a classical phosphoryl transfer reaction** Mol. Microbiol., 92 (2014), pp. 217-221
[52] E. Viguera, D. Canceill, S.D. Ehrlich **Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation** EMBO J., 20 (2001), pp. 2587-2595
[53] J.B. Parsons, M.W. Frank, P. Jackson, C. Subramanian, C.O. Rock **Incorporation of extracellular fatty acids by a fatty acid kinase-dependent pathway in *Staphylococcus aureus*** Mol. Microbiol., 92 (2014), pp. 234-245
[54]W.H. Miller, M.A. Seefeld, K.A. Newlander, I.N. Uzinskas, W.J. Burgess, D.A. Heerding, C.C. Yuan, M.S.Head, D.J. Payne, S.F. Rittenhouse, T.D. Moore, S.C. Pearson, V. Berry, W.E. DeWolf Jr., P.M. Keller, B.J. Polizzi, X. Qiu, C.A. Janson, W.F. Huffman **Discovery of aminopyridine-based inhibitors of bacterial enoyl-ACP reductase (FabI)** J. Med. Chem., 45 (2002), pp. 3246-3256
[55]D.J. Payne, W.H. Miller, V. Berry, J. Brosky, W.J. Burgess, E. Chen, W.E. DeWolf Jr., A.P. Fosberry, R.Greenwood, M.S. Head, D.A. Heerding, C.A. Janson, D.D. Jaworski, P.M. Keller, P.J. Manley, T.D. Moore, K.A. Newlander, S. Pearson, B.J. Polizzi, X. Qiu, S.F. Rittenhouse, C. Slater-Radosti, K.L. Salyers, M.A.Seefeld, M.G. Smyth, D.T. Takata, I.N. Uzinskas, K. Vaidya, N.G. Wallis, S.B. Winram, C.C. Yuan, W.F.Huffman **Discovery of a novel and potent class of FabI-directed antibacterial agents** Antimicrob. Agents Chemother., 46 (2002), pp. 3118-3124
[56]N. Kaplan, M. Albert, D. Awrey, E. Bardouniotis, J. Berman, T. Clarke, M. Dorsey, B. Hafkin, J. Ramnauth, V. Romanov, M.B. Schmid, R. Thalakada, J. Yethon, H.W. Pauls **Mode of action, *in vitro* activity, and *in vivo* efficacy of AFN-1252, a selective antistaphylococcal FabI inhibitor** Antimicrob. Agents Chemother., 56 (2012), pp. 5865-5874
[57]J.B. Parsons, M. Kukula, P. Jackson, M. Pulse, J.W. Simecka, D. Valtierra, W.J. Weiss, N. Kaplan, C.O.Roc**Perturbation of *Staphylococcus aureus* gene expression by the enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitor AFN-1252** Antimicrob. Agents Chemother., 57 (2013), pp. 2182-2190
[58] J. Yao, R.A. Carter, G. Vuagniaux, M. Barbier, J.W. Rosch, C.O. Rock **A pathogen-selective antibiotic minimizes disturbance to the microbiome** Antimicrob. Agents Chemother., 60 (2016), pp. 4264-4273
[59] A.K. Syed, S. Ghosh, N.G. Love, B.R. Boles **Triclosan promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization** mBio (2014)
[60] Y.T. Lin, J.C. Tsai, T. Yamamoto, H.J. Chen, W.C. Hung, P.R. Hsueh, L.J. Teng **Emergence of a small colony variant of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with septic arthritis during long-term treatment with daptomycin** J. Antimicrob. Chemother., 71 (2016), pp. 1807-1814
[61] C.J. Chen, C. Unger, W. Hoffmann, J.A. Lindsay, Y.C. Huang, F. Gotz **Characterization and comparison of 2 distinct epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones of ST59 lineage** PloS One, 8 (2013), Article e63210

Supplementary Table 1. Summary of animal experiments testing the efficacy of anti-FabI against *S. aureus* infections.

Tested Component	MIC µg/mL	*S. aureus* strain	Animal Model	Protocol	Cohort	Measured parameters	Results	Reference
Aminopyridin compound 9	0.5	*S. aureus* ND	Rats	Groin infection in abscess Intraperitoneal drug injection 50 mg/kg (100 X MIC)	NA	ND	2.5 log CFU reduction	[1]
"Compound 4"	0.06	*S. aureus* WCUH29	Rats	Groin infection in abscess with 6.4 log10 CFU Oral or intraperitoneal drug administration 50 mg/kg (=850 X MIC) in 1 mL: 1, 4, 7 and 24 h post-infection	N = 5	CFU in the abscess 24 h post-therapy	3-4 log CFU reduction	[2]
AEA16 ene-amides with azetidines	0.06	*S. aureus* MRSA	CD-1 mice 20 g	Intraperitoneal injection of 2.5 10^8 CFU in physiological serum, 5 % mucin in 500 µL Oral drug administration in Tween 80, 1 h and 4 h post-infection	N = 6	Septicemia Survival % over 5 days	ED50: 0.9 mg/kg/j (15 MIC) > linezolid (ED50 2.8 mg/kg/j) used against MRSA	[3]
CG400549	0.25 0.5 in serum	*S. aureus* ATCC29213	Neutropenic mice	Intraperitoneal infection Oral drug administration 100 mg/kg (200 MIC) 6 h post-infection 3 times a day for 2 d	NA	Spleen CFU after 2 days	1.7 log10 CFU reduction	[4]
CG400549	0.25 0.5 in serum	*S. aureus* ATCC29213	Swiss mice	Intraperitoneal infection with 10^8 CFU Immediate oral drug administration of doses from 25 to 100 mg/kg	NA	Survival % over 3 days	100 % survival with 100 mg/kg (200 MIC) 40 % survival with 50 mg/kg (100 MIC)	[4]
Debio 1450 (AFN-1720)	16	*S. aureus* ATCC 29213	Mice	Intramuscular infection of posterior thigh with 5.9x10^5 CFU Oral drug administration 2 h post-infection in 5 % dextrose	NA	CFU from thigh 24 h post-therapy	ED50: 2.1 mg/kg	[5]
Debio 1450 (AFN-1720)	16	*S. aureus* ATCC 29213	Mice	Intramuscular infection of posterior thigh with 5.9x10^5 CFU Intravenous drug administration 2 h post-infection in 5 % dextrose	NA	CFU from thigh 24 h post-therapy	ED50: 4.5 mg/kg	[5]
Debio 1452 (AFN-1252)	0.015	*S. aureus* Smith	CD-1 mice female 20 g	Intraperitoneal infection with 35 X LD50 (LD50= 5 10^3) in 500 µL mucin. Oral drug administration 30 min post-infection	N = 5 X 3	Septicemia Survival % over 5 days	Infection kills in 24-48 h without treatment 50 % survival with 0.2 mg/mL (13 MIC) 100 % survival with 0.8 mg/mL (55 MIC)	[6]
Debio 1452 (AFN-1252)	0.015	*S. aureus* Wood46	CD-1 mice female 6-8 weeks (*i.e.* > 20g)	Sub-cutaneous infection in a 5 d granuloma pouch with 7.1 to 7.5 log10 CFU in 100 µL Oral drug administration of 100 mg/kg (6670 X MIC) after 2, and/or 26 and 50 h post-infection	NA	Pouch liquid CFU 48 h post-therapy TSA agar with 5 % active charcoal	Low effect for the first 12 h post-treatment 3 log CFU reduction in 24 and 48 h 5 log CFU reduction with 1 dose/day for 3 days Drug efficacy comparable to linezolid on rats	[7]
Debio 1452 (AFN-1252)	0.016	*S. aureus* ATCC 29213	Mice	Intramuscular infection of posterior thigh with 5.9x10^5 CFU Oral drug administration 2 h post-infection in 5 % dextrose	NA	CFU from thigh 24 h post-therapy	913 AUC0-24/MIC for 1 log dead bacteria	[5]
MUT056399	0.03 -0.12	MSSA (ATCC29213) MRSA VISA	Swiss mice female 6 weeks	Intramuscular infection of the thigh with 3.1 10^6 to 9.1 10^6 CFU Subcutaneous drug administration 1.5 h post-infection	N = 5	CFU from thigh 20 h post-infection Bacteriostatic dose determination	Bacteriostatic dose: 40-45.5 mg/kg/j (335 MIC) Drug efficacy same as linezolid in same model: 50 mg/kg/j	[8]
MUT056399	0.03 - 0.12	MSSA (ATCC29213) MRSA VISA	Swiss mice female 6 weeks	Intraperitoneal infection in 10 % mucin Subcutaneous drug administration 10 min post-infection	N = 6	Septicemia Survival % over 2 days	ED50: 19.3 to 49.6 mg/kg/j (160-415 MIC)	[8]
Triclosan	ND	*S. aureus* SH1000	Rats	Gavaged with 1 mL of triclosan resuspended in corn oil at 100 mg/kg/d for 3 d Nasal infection 5 days later with 10^5 or 10^8 CFU	N = 5	Nasal CFU 7 days post-infection	Colonization enhanced by triclosan treatment	[9]
Debio 1452 (AFN-1252)	ND	*S. aureus* MSSA & MRSA	Humans male 19-64	Patients with wound infection / cutaneous abscess / cellulitis Oral drug administration of 200 mg immediate release tablets Twice a day up to 14 d	N ~ 100	Fever and skin infection area	20 % infection surface decrease in 3 d *S. aureus* detectable after 3 d > 90 % eradication rate at short and long term follow up Healing median time: 10 d No isolates with increased MIC post-treatment	[10]

Abbreviations are as follows: MIC: Minimal inhibitory concentration; ED50: median effective dose with effect on 50 % of the population; LD50, lethal dose killing 50 % of the population; Ref: Reference; NA: data not available; MRSA: Methicillin resistant *S. aureus*; MSSA: Methicillin sensitive *S. aureus*; VISA: Vancomycin Intermediate *S. aureus*.

Supplementary Table 2. Summary of animal experiments testing the efficacy of anti-FASII not targeting FabI to treat *S. aureus* infections.

Target	Tested Component	MIC µg/mL	*S. aureus* strain	Animal Model	Protocol	Cohort	Measured parameters	Results	Ref
ACC	Pyrrolidinedione compound 7	0.01	*S. aureus* ED133	Female CFW1 mice 20 g	Intraperitoneal infection with 10^6 CFU in 5% mucin 250 µL Intravenous or intraperitoneal drug administration in 200 µL 30 min post-infection	N = 5	Septicemia Survival % over 5 d	100 % survival with 25 mg/kg (2500 MIC; quantity 4 X higher than with linezolid)	[1]
ACC	Pyrrolidinedione compound 5	0.06 to 2	*S. aureus* ED133	Female CFW1 mice 20 g	Intraperitoneal infection with 10^4 CFU in 20 % mucin 250 µL Intravenous drug administration of 100 µL at 10 mg/kg (5X MIC) 30 and 90 min post-infection	NA	CFU in lungs, liver, peritoneum and blood after 5 h	Some compounds are close to linezolid efficiency but with 2 injections instead of 1 and on lower bacterial burden	[1]
FabF	Platensimycin	0.5 -2 in serum	*S. aureus* Smith	Mice	Intraperitoneal infection with 1.7 X 10^3 CFU Intravenous drug administration of 100 µg/h (60X MIC) for 24 h 30 min post-infection	N = 5 X 2	CFU in kidneys after 24 h	4 to 5 log CFU reduction 20 % kidneys without detected bacteria	[2]
FabF/H	Platencin	8 in serum	*S. aureus* Smith	Mice	Intraperitoneal infection with 4. 10^3 CFU in 500 µL mucin Intravenous drug administration of 150 µg/h (22X MIC) for 24 h 30 min post-infection	N = 7 with treatment N = 5 without	CFU in kidneys after 24 h Chapman plates	3 log CFU reduction in kidneys	[3]
FASII	Infectivity of FASII auxotroph *accD*	ND	*S. aureus* RN6930	Mice	Intraperitoneal infection with 10^6 CFU WT and 10^7 CFU for *ΔaccD* et *accC** in 100 µL mucin	N = 6 X 2	CFU in blood 24h post-therapy LB agar plates supplemented with FA and lipoic acid	10^6 WT CFU/mL *ΔaccD* and *accC** undetected	[4]
FASII	Infectivity of FASII auxotroph *fabD*	ND	*S. aureus* Newman *fabD*	Female BALB/c 6 week mice	Intravenous infection with 10^6 CFU	N = 6 X 2	CFU in liver and kidneys 2 d and 6 d post-infection BHI serum + FA in plates	3.5 log CFU reduction in liver and kidneys after 2 d Persistence in liver and kidneys after 6 d No difference with WT after 6 d in kidneys	[5]
FabF	Thiolactomycin analog TLM6	64	*S. aureus* MRSA BAA 1762	Swiss Neutropenic mice 6 week male 30 g	Intraperitoneal infection with 2.5.10^7 CFU Subcutaneous drug injection 1 and 25 h post infection with 100 mg/kg/injection	N = 6	Survival time	Average survival time of 3 d (compared to 5 d with vancomycin) ED50~125 mg/kg (compared to <30 mg/kg for vancomycin)	[6]

Abbreviations are as follows: MIC: Minimal inhibitory concentration; Ref: Reference; NA: data not available; d: day; FA: Fatty acids; *accC** is a fatty acid auxotroph with a missense mutation in the *accC* gene, encoding an AccC(H207R) enzyme; see ref. [4] for further information.

[1] C. Freiberg, J. Pohlmann, P.G. Nell, R. Endermann, J. Schuhmacher, B. Newton, M. Otteneder, T. Lampe, D. Habich, K. Ziegelbauer, Novel bacterial acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors with antibiotic efficacy *in vivo*, Antimicrob. Agents Chemother., 50 (2006) 2707-2712.
[2] J. Wang, S.M. Soisson, K. Young, W. Shoop, S. Kodali, A. Galgoci, R. Painter, G. Parthasarathy, Y.S. Tang, R. Cummings, S. Ha, K. Dorso, M. Motyl, H. Jayasuriya, J. Ondeyka, K. Herath, C. Zhang, L. Hernandez, J. Allocco, A. Basilio, J.R. Tormo, O. Genilloud, F. Vicente, F. Pelaez, L. Colwell, S.H. Lee, B. Michael, T. Felcetto, C. Gill, L.L. Silver, J.D. Hermes, K. Bartizal, J. Barrett, D. Schmatz, J.W. Becker, D. Cully, S.B. Singh, Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties, Nature, 441 (2006) 358-361.
[3] J. Wang, S. Kodali, S.H. Lee, A. Galgoci, R. Painter, K. Dorso, F. Racine, M. Motyl, L. Hernandez, E. Tinney, S.L. Colletti, K. Herath, R. Cummings, O. Salazar, I. Gonzalez, A. Basilio, F. Vicente, O. Genilloud, F. Pelaez, H. Jayasuriya, K. Young, D.F. Cully, S.B. Singh, Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with *in vivo* antibiotic properties, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104 (2007) 7612-7616.
[4] J.B. Parsons, M.W. Frank, J.W. Rosch, C.O. Rock, *Staphylococcus aureus* fatty acid auxotrophs do not proliferate in mice, Antimicrob. Agents Chemother., 57 (2013) 5729-5732.
[5] C. Morvan, D. Halpern, G. Kénanian, C. Hays, J. Anba-Mondoloni, S. Brinster, S. Kennedy, P. Trieu-Cuot, C. Poyart, G. Lamberet, K. Gloux, A. Gruss, Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials, Nat. Commun., 7 (2016) 12944.
[6] G.R. Bommineni, K. Kapilashrami, J.E. Cummings, Y. Lu, S.E. Knudson, C. Gu, S.G. Walker, R.A. Slayden, P.J. Tonge, Thiolactomycin-based inhibitors of bacterial beta-ketoacyl-ACP synthases with *in vivo* activity, J Med. Chem., 59 (2016) 5377-5390.

[1] W.H. Miller, M.A. Seefeld, K.A. Newlander, I.N. Uzinskas, W.J. Burgess, D.A. Heerding, C.C. Yuan, M.S. Head, D.J. Payne, S.F. Rittenhouse, T.D. Moore, S.C. Pearson, V. Berry, W.E. DeWolf, Jr., P.M. Keller, B.J. Polizzi, X. Qiu, C.A. Janson, W.F. Huffman, Discovery of aminopyridine-based inhibitors of bacterial enoyl-ACP reductase (FabI), J Med. Chem., 45 (2002) 3246-3256.
[2] D.J. Payne, W.H. Miller, V. Berry, J. Brosky, W.J. Burgess, E. Chen, W.E. DeWolf Jr, Jr., A.P. Fosberry, R. Greenwood, M.S. Head, D.A. Heerding, C.A. Janson, D.D. Jaworski, P.M. Keller, P.J. Manley, T.D. Moore, K.A. Newlander, S. Pearson, B.J. Polizzi, X. Qiu, S.F. Rittenhouse, C. Slater-Radosti, K.L. Salyers, M.A. Seefeld, M.G. Smyth, D.T. Takata, I.N. Uzinskas, K. Vaidya, N.G. Wallis, S.B. Winram, C.C. Yuan, W.F. Huffman, Discovery of a novel and potent class of FabI-directed antibacterial agents, Antimicrob. Agents Chemother., 46 (2002) 3118-3124.
[3] M. Takhi, K. Sreenivas, C.K. Reddy, M. Munikumar, K. Praveena, P. Sudheer, B.N. Rao, G. Ramakanth, J. Sivaranjani, S. Mulik, Y.R. Reddy, K. Narasimha Rao, R. Pallavi, A. Lakshminarasimhan, S.K. Panigrahi, T. Antony, I. Abdullah, Y.K. Lee, M. Ramachandra, R. Yusof, N.A. Rahman, H. Subramanya, Discovery of azetidine based ene-amides as potent bacterial enoyl ACP reductase (FabI) inhibitors, Eur. J. Med. Chem., 84 (2014) 382-394.
[4] W. Balemans, N. Lounis, R. Gilissen, J. Guillemont, K. Simmen, K. Andries, A. Koul, Essentiality of FASII pathway for *Staphylococcus aureus*, Nature, 463 (2010) E3; discussion E4.
[5] N. Kaplan, B. Hafkin, Preclinical pharmacokinetics and efficacy of Debio 1450 (Previously AFN-1720), a prodrug of the Staphylococcocal-specific Antibiotic Debio 1452 (Previously AFN-1252), Poster, ECCMID 2014, Barcelona, Spain, (2014).
[6] N. Kaplan, M. Albert, D. Awrey, E. Bardouniotis, J. Berman, T. Clarke, M. Dorsey, B. Hafkin, J. Ramnauth, V. Romanov, M.B. Schmid, R. Thalakada, J. Yethon, H.W. Pauls, Mode of action, *in vitro* activity, and *in vivo* efficacy of AFN-1252, a selective antistaphylococcal FabI inhibitor, Antimicrob. Agents Chemother., 56 (2012) 5865-5874.
[7] J.B. Parsons, M. Kukula, P. Jackson, M. Pulse, J.W. Simecka, D. Valtierra, W.J. Weiss, N. Kaplan, C.O. Rock, Perturbation of *Staphylococcus aureus* gene expression by the enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitor AFN-1252, Antimicrob. Agents Chemother., 57 (2013) 2182-2190.
[8] S. Escaich, L. Prouvensier, M. Saccomani, L. Durant, M. Oxoby, V. Gerusz, F. Moreau, V. Vongsouthi, K. Maher, I. Morrissey, C. Soulama-Mouze, The MUT056399 inhibitor of FabI is a new antistaphylococcal compound, Antimicrob. Agents Chemother., 55 (2011) 4692-4697.
[9] A.K. Syed, S. Ghosh, N.G. Love, B.R. Boles, Triclosan promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization, mBio, doi: 10.1128/mBio.01015-13 (2014).
[10] B. Hafkin, N. Kaplan, B. Murphy, Efficacy and safety of AFN-1252, the first *Staphylococcus*-specific antibacterial agent, in the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections, including those in patients with significant comorbidities, Antimicrob. Agents Chemother., 60 (2016) 1695-1701.

2) Microscopie électronique

Afin de mieux comprendre l'adaptation aux acides gras exogènes et les mécanismes mis en jeu par les bactéries, nous avons entrepris une observation au microscope électronique à différents temps de la phase d'adaptation.

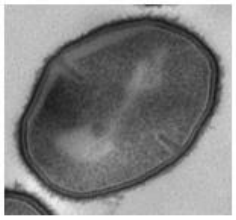
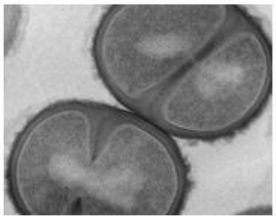
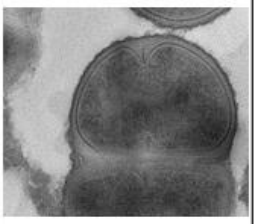
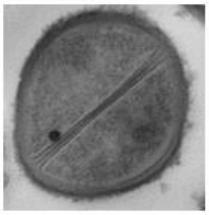
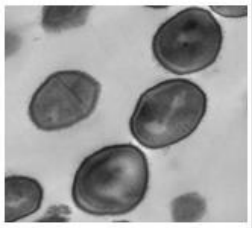
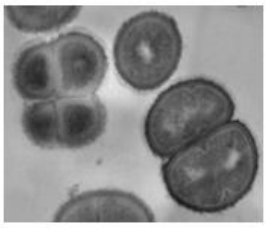
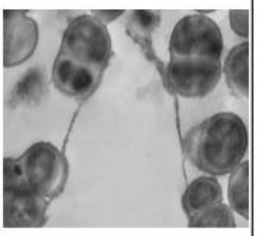
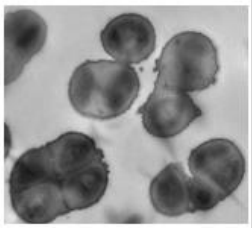
Conditions / Grossissement	SFA	SFAT 2h	SFAT 6h	SFAT 11h
25 000 X				
10 000 X				
	Comme BHI	Epaississement de la paroi / diminution de de la membrane cellulaire + molécules surface paroi	Toutes les cellules apparaissent bloquées dans leurs divisions	Mélange de cellules: Etat BHI & état d'adaptation

Fig. 1 : Image en microscopie électronique au grossissement 10 000 et 25 000 durant l'adaptation 2, 6 et 11 heures de la souche JE2. *Image produite avec le concours de Christine Longin.*

Ces images nous ont permis d'observer une diminution de la taille des cytoplasmes apparaissant à 2 h. Cette diminution est accentuée jusqu'à 6 h (le milieu de la phase d'adaptation). Par la suite la taille des cytoplasmes semble revenir à la normale à la fin de cette phase d'adaptation. L'observation en microscope électronique confirme les résultats de microscopie à fluorescence concernant le possible problème de division cellulaire. En effet, la présence d'un grand nombre de tétrades est observée en milieu contant l'anti-FASII.

Une comparaison a été initiée avec notre souche contrôle incapable de prendre les acides gras exogènes : FakA.

Le rétrécissement de la membrane plasmique semble plus important à 6 h chez ce mutant que pour la souche WT. Ce rétrécissement pourrait donc être lié soit à l'indisponibilité des acides gras exogènes soit à la réponse stringente.

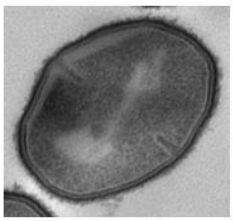
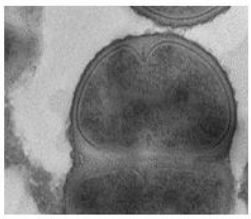
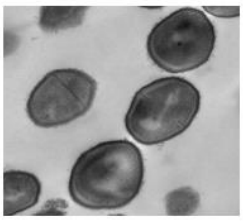
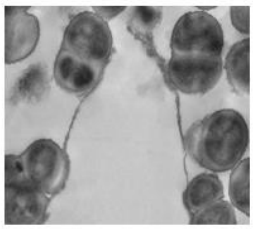
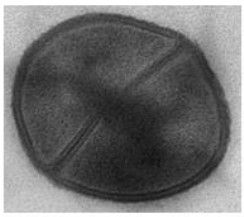
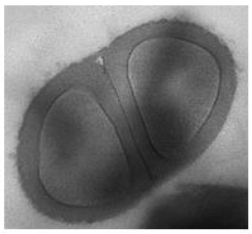
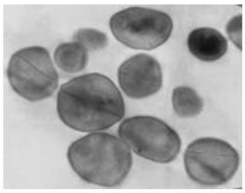
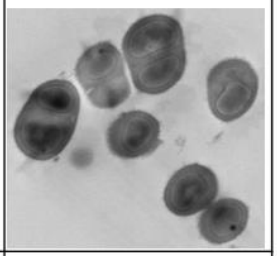
Conditions / Grossissement	25 000 X		10 000 X	
	SFA	SFAT 6h	SFA	SFAT 6h
WT				
FakA				
	Comme BHI	Diminution de la taille des cytoplasme très importante, homogénéité chez *fakA*	Comme BHI	2 *versus* 4

Fig. 2 : Image en microscopie électronique au grossissement 25 000 et 10 000 de la souche fakA versus la souche WT JE2. *Image produite avec le concours de Christine Longin.*

Une différence est toutefois visible concernant le nombre de tétrades et de diplocoques. En effet, le mutant FakA ne semble pas former de tétrades. Il est possible que l'arrêt de la division cellulaire chez le mutant FakA soit plus important que dans la souche WT empêchant ainsi la division cellulaire dans un stade plus précoce.

Les images de microscopie électronique ont mis en lumière un espace entre ce qui semble être le cytoplasme et la paroi cellulaire. Nous avons voulu déterminer les changements cellulaires durant cette adaptation, à savoir s'il y a ou non un changement de la taille globale de la cellule, et mesurer cet espace dans les différentes conditions. Ces informations nous permettent d'imaginer qu'il y a principalement une réduction de la taille du cytoplasme (due sûrement à la baisse de la quantité d'acides gras disponibles pour la cellule réduisant ainsi la taille du cytoplasme). La taille globale des cellules ne changeant pas, nous irions plus vers cette l'hypothèse plutôt que vers celle d'un épaississement de la paroi comme précédemment imaginé.

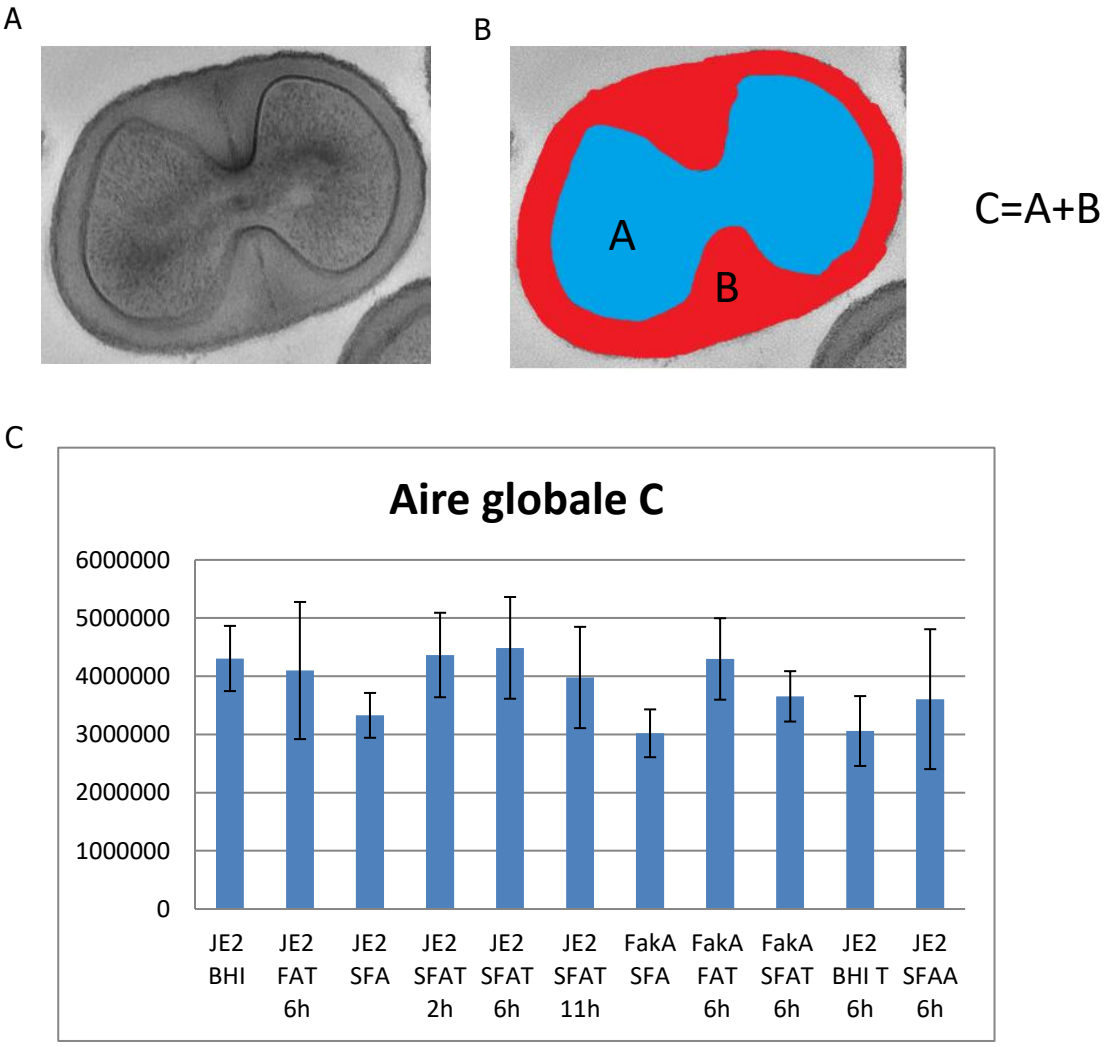


Fig. 3 : A : Exemple d'une cellule mesurée. B : Sélection des aires sur le premier exemple. C : Aire globale des cellules, soit la somme de l'aire A et B.

La taille globale des bactéries de la souche WT en SerFA-Tric durant l'adaptation semble être identique à la taille des cellules en BHI. On peut noter une légère baisse pour le mutant FakA par rapport à la souche WT. Cette observation peut être expliquée par la présence de tétrades chez la souche WT non visibles chez le mutant *fakA*.

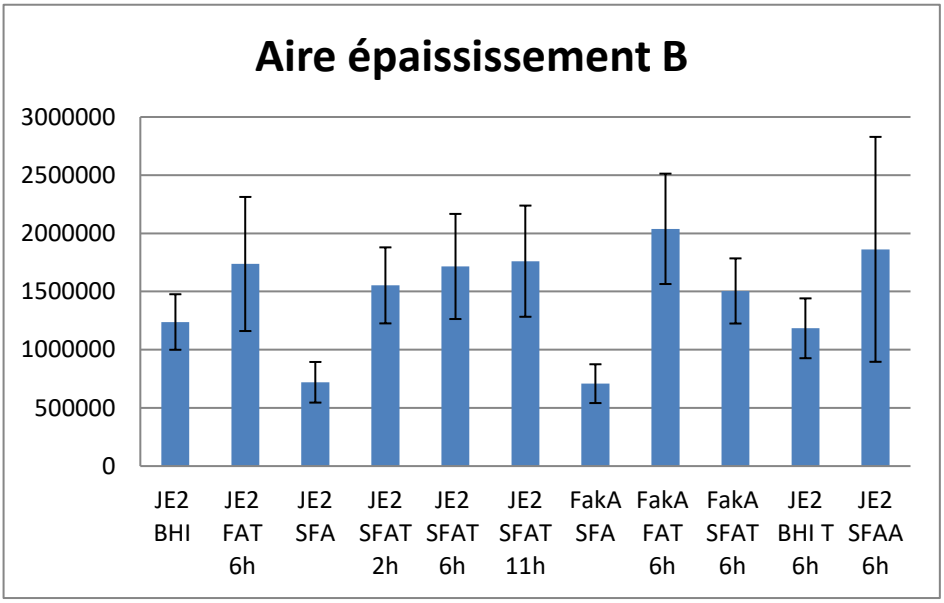


Fig. 4 : Aire de l'épaississement créée entre le cytoplasme et la paroi.

La comparaison entre les cellules en culture en SerFA-Tric et SerFA (avec ou sans anti-FASII) a permis de déterminer une augmentation de la zone entre le cytoplasme et ce qui semble être la paroi. Il est important de noter que pour chaque condition, 40 cellules ont été mesurées, ces cellules pouvant être à des stades cellulaires différents, en dimères ou en tétrades ceci compliquant les comparaisons d'aire globale. Nous retrouvons avec ces images l'observation faite en microscopie à fluorescence (article n°2), à savoir la présence de cellules en tétrades uniquement en présence d'anti FASII.

3) Résultats PACBIO

L'adaptation aux acides gras exogènes et le contournement de la voie FAS II n'est pas à première vue liée à une mutation de l'ADN. Dans ce cas nous avons voulu savoir si d'autres types de modifications de l'ADN pouvaient avoir lieu durant cette adaptation. Parmi celles-ci, nous avons décidé de faire un séquençage type « PACBIO » permettant de visualiser le taux de méthylation sur le génome ainsi que les possibles réarrangements de l'ADN. Cette expérience n'a pas abouti pour plusieurs raisons discutées par la suite. Néanmois après une analyse plus approfondie, il est possible qu'elle puisse donner des pistes pour des analyses ultérieures.

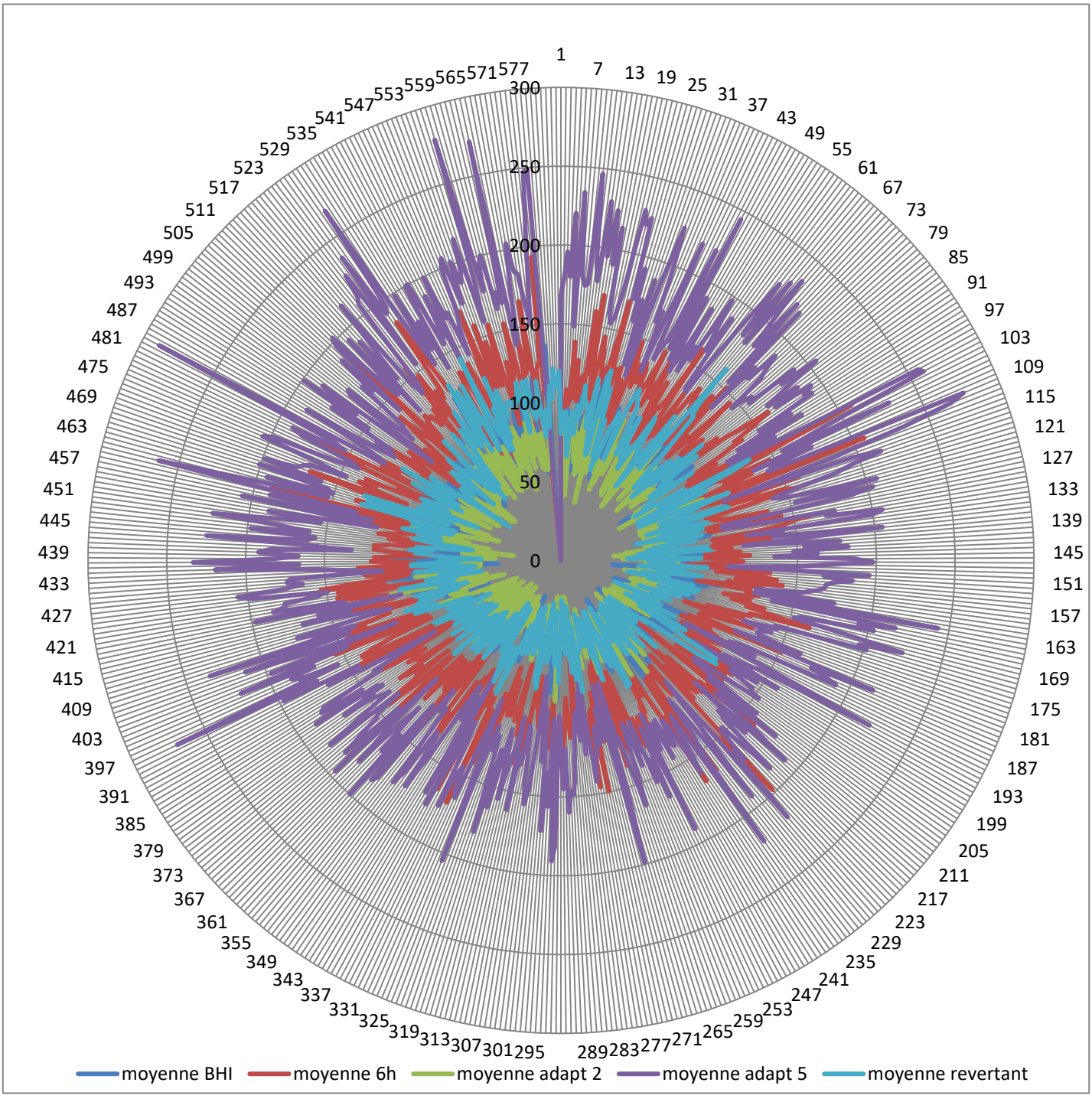


Fig. 6 : ***Représentation du taux de méthylation sur les génomes.*** *Chaque unité représente 5000 paires de base.*

Nous pouvons résumer le taux global de méthylation par génome dans le tableau ci-dessous :

conditions	méthylation
BHI	+
6h	++
Adapté 2	+
Adapté 5	+++
Révertant	+

Ces résultats pourraient faire apparaître une suite logique, c'est-à-dire une augmentation de la méthylation durant l'adaptation, et une diminution de cette méthylation dans la souche révertante si l'on regarde ce tableau sans la ligne noire.

Une des premières problématiques mettant à mal nos résultats et cette logique est le fait que la souche étudiée à 6 h est la même que celle utilisée pour étudier le génome appelé « Adapté 2 ». La deuxième zone d'amélioration est le nombre d'échantillons analysés qui est faible. Un triplicas par condition semble essentiel, malgré le coût que cela peut engendrer. Enfin l'analyse informatique a été en partie externalisée, ce qui ne nous a pas permis d'analyser à notre convenance ces résultats.

Malgré cela, nous pouvons voir des différences notables de méthylation entre ces différents génomes d'un point de vue global, ainsi que sur des zones spécifiques semblant être sur- ou sous-méthylées. En effet, il est connu qu'une hyper méthylation de l'ADN est responsable de la diminution de l'expression des gènes et inversement avec l'hypo méthylation, ce qui pourrait jouer un rôle important pour notre phénomène étudié. Une étude plus approfondie des motifs de méthylation devra donc être faite, en recoupant ces données avec celles de protéomique. Une convergence pourrait peut-être en ressortir. Il est aussi possible, après analyse des zones hyper et hypo méthylées d'analyser en RNseq ces zones, afin de compléter l'analyse comme réalisée dans cette étude (276).

Enfin, pour une analyse plus complète il est important de noter que ce type de séquençage ne permet pas de voir les mutations du type SNP à cause du grand nombre d'erreurs que produit la polymérase. Un séquençage illumina devra être fait sur le génome étudié en PACBIO, si une étude des SNP est envisagée.

Matériel et méthodes de l'annexe

La microscopie électronique

Les cultures bactériennes ont été culotées après avoir atteint la densité optique ci-dessous et lavées 2 fois en PBS à 6000 rpm pendant 4 minutes à température ambiante.

	Condition de culture	OD_{600}	Equivalent bactérien OD600 dans 400 µl	Concentration approximative de cellules par µl
1	JE2 - BHI	2.5	12.5	~$1x10^7$ / µl
2	JE2 – SerFA	1.8	9	~$1x10^7$ / µl
3	JE2 – SerFA-Tric 1h	~0.1	1	~$1x10^6$ / µl
4	JE2 – SerFA-Tric 6h	0.4	4	~$4x10^6$ / µl
5	JE2 – SerFA-Tric 12h	0.6	2	~$2x10^6$ / µl
6	LpdA – BHI	2	10	~$1x10^7$ / µl
7	LpdA - SerFA	2	10	~$1x10^7$ / µl
8	LpdA – SerFA-Tric 6H	0.4	4	~$4x10^6$ / µl
9	FakA - SerFA	2.5	12.5	~$1x10^7$ / µl
10	FakA – SerFA-Tric 6H	0.4	4	~$4x10^6$ / µl
11	MutS - SerFA	1.9	9.5	~$1x10^7$ / µl
12	MutS – SerFA-Tric 6H	0.5	5	~$6x10^6$ / µl

Les cultures ont été fixées avec 2 % de glutaraldéhyde en tampon Cacodylate de sodium 0.1M (pH 7.2) pendant une heure à température ambiante, puis conservées à 4°C. Les échantillons ont été par la suite contrastés avec du Oolong Tea Extract (OTE) 0.5 % dans du tampon cacodylate, postfixé avec 1 % de tetroxide osmium contenant 1,5 % de cyanoferrate de potassium, progressivement déshydraté dans l'éthanol (30 à 100 %), et substitué progressivement dans un mélange de propylène-epon et incorporé dans Epon. (Delta microscopie – Labège France). Des coupes minces (70 nm) ont été collectées sur des grilles de cuivre de 200 mesh et contrastées avec du citrate de plomb. Les grilles ont été examinées avec un microscope électronique Hitachi HT7700 fonctionnant à 80 kV (Elexience – France), et les images ont été acquises avec une caméra à dispositif à couplage de charge (AMT). Ce travail a été réalisé par Christine Longin, et a bénéficié des installations et de l'expertise de MIMA2 MET-UMR 1313 GABI, INRA, équipe Plateformes, 78352 Jouy-en-Josas, France.

Méthylation de l'ADN par la méthode PACBIO

Cette expérimentation demande une grande quantité d'ADN sans impureté. Le protocole utilisé provient de l'Institut pour la science du génome (Université du Maryland): centre des ressources génomiques version 2.04, de Naomi Sengamalay du 23/12/2014.

Extraction de l'ADN :

Pour cela 50 mL de culture ont été utilisés. Les cellules ont été culotées par centrifugation à 5500 g pendant 5 minutes. Les cellules ont étés resuspendues dans 4,7 mL du buffer TE. 120 µL de lystostaphine à 5 mg/ml ont été rajoutés, vortéxés et incubés à 37°C pendant 30 minutes puis revortéxés à nouveau, et incubés 15 autres minutes. Ensuite sont rajoutés 250 µl de SDS 10% et 62.5 µL du cocktail RNase (Invitrogen, #AM2286), le tout est vortéxé et incubé à 37°C pendant 1 heure. Par la suite 25 µL d'une solution de protéinase K sont ajoutés, vortéxés et incubés à 55°C pendant 1 heure. Ensuite 900 µL de NaCl à 5 M sont rajoutés puis un nouveau passage au vortex est réalisé. Préchauffage de CTAB/NaCl à 65°C afin de réduire la viscosité puis 750 µL de cette solution sont rajoutés, mixés et incubés à 65°C pendant 20 minutes. Ensuite 6,69 ml du mélange Chloroforme/Isoamyl alcool (24 :1) à température ambiante rajoutés et vortexés puis centrifugés à 6000 g pendant 30 minutes à température ambiante. Par la suite, la phase aqueuse (supérieure) a été récupérée sans toucher à l'interface blanche dans un nouveau tube. Une quantité égale d'isopropanol est rajoutée, puis le tube est mélangé délicatement 50 fois. L'ADN va former une masse collante. Les tubes sont centrifugés à 2000 g pendant 5 minutes à 4°C, puis le surnageant est délicatement enlevé. Ensuite de l'éthanol froid à 70% est rajouté puis vortexage. Une nouvelle centrifugation est réalisée à 2000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est de nouveau enlevé et laissé séché. Pour enlever toute trace de CTAB/NaCl, une précipitation à l'éthanol a été faite avec 2,5 fois le volume d'éthanol 100 % avant de resuspendre dans 500 µl de tris, centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min, le surnageant est enlevé, le culot est rincé à l'éthanol 70 % froids (-20°C) puis le culot sec d'ADN est resuspendu en Tris 10 mM. La solution de protéinase K a été préparé dans un tube 50 ml avec 200 mg de protéinase K, 29.4 mg de Calcium chloride déshydraté, de 100 µl de Tric 1M à ph 7,5. Le tout complété à 5 ml avec de l'eau nucléase-free puis 5 ml de glycérol est rajouté. Le tout est stocké à -20°C. Pour la solution de CTAB/NaCl, 10 g de CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) a été ajouté à 4,09 g de NaCl, le tout complété par de l'eau nucléase-free pour avoir 100 mL.

Analyse informatique :

L'analyse informatique a été faite par l'équipe de Luke Tallon de l'Université du Maryland à l'institut des sciences du génome de l'école de médecine. Les analyses sont résumées par le schéma ci-dessous.

Mesure des aires

La mesure des aires a été faite à partir du logiciel ImageJ version 1.51s. Le traçage des zones a été fait à la main sur 40 bactéries dans chacune des conditions.

Références

1. NCBI. (2018) Nombre de résultat en tapant *Staphylococcus aureus* sur Pubmed.
2. Yves Le Loir, M. G. (2010) *Staphylococcus aureus*. *Lavoisier*
3. Witte, W. (1984) On Abscesses. *Reviews of Infectious Deseases* **6**
4. Commons, W. (2018) Photographie d'Alexandre Ogston.
5. Gaspard-Félix Tournachon, p. N. (before 1895) Photographie de Louis Pasteur.
6. Kaiser, G. E. (2017) TSA Plate Culture of the Chromogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*.
7. bacterio.net. (2018) List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
8. Ogunseitan, O. Microbial Diversity. *Blackwell Publishing*
9. Jeffrey L. Bose, P. D. F., Kenneth W. Bayles. (2013) Genetic tools to enhance the study of gene function and regulation in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2218-2224
10. Alice R. Wattam, J. J. D., Rida Assaf, Sébastien Boisvert, Thomas Brettin, Christopher Bun, Neal Conrad, Emily M. Dietrich, Terry Disz, Joseph L. Gabbard, Svetlana Gerdes, Christopher S. Henry, Ronald W. Kenyon, Dustin Machi, Chunhong Mao, Eric K. Nordberg, Gary J. Olsen, Daniel E. Murphy-Olson, Robert Olson, Ross Overbeek & 8 others Bruce Parrello, Gordon D. Pusch, Maulik Shukla, Veronika Vonstein, Andrew Warren, Fangfang Xia, Hyunseung Yoo, Rick L. Stevens. (2017) Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res* **45**, D535-D542
11. (Raisin), R. d. a. d. i. e. d. s. d. i. n. (2012) Rapport de l'Enquête Nationale de Prévalence (ENP) des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux dans les établissements de santé publique français. *Institut de veille sanitaire*
12. European Food Safety Authority, E. C. f. D. P. a. C. (2017) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* **15**
13. Steven Y. C. Tong, J. S. D., Emily Eichenberger, Thomas L. Holland, and Vance G. Fowler, Jr. (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* **28**, 603-661
14. Steven Y. C. Tong, L. F. C., Vance G. Fowler. (2012) Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol* **34**, 185-200
15. Johanna Ulrica Ericson Sollid, A. S. F., Anne-Merethe Hanssen, Mona Johannessen. (2014) *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol* **21**, 531-541
16. Heiman Wertheim, D. C. M., Margreet Vos, Willem van Leeuwen, Alex van Belkum, Henri Verbrugh, Jan Nouwen. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases* **5**, 751-762
17. Wesley E. Kloos, K. H. S. (1975) Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus simulans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **25: 62-79,**
18. Wesley E. Kloos, K. H. S. (1983) *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an Inhabitant of the Human External Ear. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **33: 9-14**
19. Alexander Zipperer, M. C. K., Claudia Laux, Anne Berscheid, Daniela Janek, Christopher Weidenmaier, Marc Burian, Nadine A. Schilling, Christoph Slavetinsky, Matthias Marschal, Matthias Willmann, Hubert Kalbacher, Birgit Schittek, Heike Brötz-Oesterhelt, Stephanie Grond, Andreas Peschel et Bernhard Krismer. (2016) Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **535**, 511-516
20. Christopher J. Bailey, B. P. L., Maria B. Redpath, Thomas P. Smith. (1995) The epidermolytic (exfoliative) toxins of *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol.* **184(2):53-61.**
21. Pasteur, S. i. I. (2016) Staphylocoque.
22. Jesús López-Alcalde, M. M. M., Marcela Guevara, Lucieni O Conterno, Ivan Solà, Sheila Cabir Nunes, Xavier Bonfill Cosp. (2015) Gloves, gowns and masks for reducing the transmission of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the hospital setting. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007087

23. András N. Spaan, T. H., Willemien J.M. van Rooijen, Magali Perret, Cédric Badiou, Piet C. Aerts, Johan Kemmink, Carla J.C. de Haas, Kok P.M. van Kessel, François Vandenesch, Gérard Lina, Jos A.G. van Strijp. (2013) The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* **13**, 584-594
24. Franklin D. Lowy, M. D. (1998) *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine* **339**, 520-532
25. Dorothee Grumann, U. N., Barbara M. Bröker. (2014) *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. *Infect Genet Evol* **21**, 583-592
26. Sarah Ehlers, S. A. M. (2018) Staphylococcus Saprophyticus. *StatPearls Publishing*
27. Francis C. Neuhaus, a. J. B. (2003) A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 686-723
28. Weidenmaier, C., and Peschel, A. (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 276
29. Stephanie Brown, J. S. M., Suzanne Walker. (2013) Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **67**, 313-336
30. Grundling, M. G. P. a. A. (2014) Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Review of Microbiology* **68**, 81-100
31. Stephanie Brown, G. X., Lyly G. Luhachack, Jennifer Campbell, Timothy C. Meredith, Calvin Chen, Volker Winstel, Cordula Gekeler, Javier E. Irazoqui, Andreas Peschel, and Suzanne Walker. (2012) Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. *PNAS* **109:18909-18914**
32. Longin, C. (2017) plateforme MIMA2, INRA.
33. acharya, T. (2013) Teichoic Acid/Lipoteichoic acid: Characteristics and Medical Importance. *Microbe Online*
34. William E. Sause, P. T. B., William R. Strohl, A. Simon Lynch, Victor J. Torres. (2015) Antibody-Based Biologics and Their Promise to Combat *Staphylococcus aureus* Infections. *Trends in Pharmacological Sciences* **Volume 37**, Pages 231-241
35. Brian Gray, P. H., and Hattie Gresham (2013) Targeting agr- and agr-Like Quorum Sensing Systems for Development of Common Therapeutics to Treat Multiple Gram-Positive Bacterial Infections. *Sensors* **13(4), 5130-5166**
36. Rachel J. Gordon, F. D. L. (2008) Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis.* **46(Suppl 5): S350–S359**
37. Nathan K. Archer, M. J. M., J. William Costerton, Jeff G. Leid, Mary, Elizabeth Powers & Mark E. Shirtliff. (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* **2:5, 445-459;**
38. Hung Ton-That, G. L., Sarkis K. Mazmanian, Kym F. Faull, and Olaf Schneewind. (1999) Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(22)**
39. Andrea C. DeDent, M. M., Olaf Schneewind. (2007) Distribution of protein A on the surface of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 4473-4484
40. Stephen Cary, M. K., Tony N. Marion, Gregg J .Silverman. (1999) The murine clan V(H) III related 7183, J606 and S107 and DNA4 families commonly encode for binding to a bacterial B cell superantigen. *Mol Immunol.* **36(11-12):769-76**
41. Jörg Hartleib, N. K., Richard B. Dickinson, Gursharan S. Chhatwal, Jan J. Sixma, Orla M. Hartford, Timothy J. Foster, Georg Peters, Beate E. Kehrel, and Mathias Herrmann. (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *BLOOD* **96**, 2149-2156
42. Kok P. M. van Kessel, J. B., and Jos A. G. van Strijp. (2014) Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front Immunol.* **5: 467.**
43. Köckritz-Blickwede, M. v. (2009) A Pathogen's Swiss Army Knife. *American Society for Microbiology*
44. Triantafyllos Chavakis, K. W., Klaus T Preissner, Mathias Herrmann. (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost.* **94(2):278-85.**

45. Stefan A. Hienz, M. P., Jan-ingmar Flock. (1996) Insertional inactivation of the gene for collagen-binding protein has a pleiotropic effect on the phenotype of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **178(17):5327-9.**
46. Joseph Patti, T. B., D Krajewska-Pietrasik, Arturo Abdelnour, A Tarkowski, C Rydén, Magnus Höök. (1994) The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun.* **62(1):152-61.**
47. Mohamed O Elasri, J. R. T., R.A Skinner, J.S Blevins, Karen E. Beenken, C.L Nelson, Mark S. Smelter. (2002) *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* **30**, 275-280
48. Jan-Ingmar Flock, G. F., Klas Jonsson, Bengt Guss, Christer Signiis, Bjorn Nilsson, Giuseppe Raucci, Magnus Hook, Torkel Wadstrom and Martin Lindbergl. (1987) Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **6(8):2351-7.**
49. Oonagh Shannon, J.-I. F. (2004) Extracellular fibrinogen binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* binds to platelets and inhibits platelet aggregation. *Thromb Haemost.* **91(4):779-89.**
50. Hwan Keun Kim, V. T., Olaf Schneewind, Dominique Missiakas. (2012) Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* **15**, 92-99
51. Maria I. Bokarewa, T. J., Andrej Tarkowski. (2006) *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 504-509
52. Otto, A. P. M. (2013) Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology* **11, pages 667–673**
53. Michal Bukowski, B. W., and Grzegorz Dubin. (2010) Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)* **2(5): 1148–1165.**
54. Fanny Vincenot, M. S., Gilles Prévost. (2008) Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *RFL - Revue francophone des laboratoires* **Vol 38, N° 407**, pp. 61-69
55. Panton, P. N., and Valentine, F. C. O. (1932) Staphylococcal toxin *The Lancet* **219**, 506-508
56. Dorothee Grumann, U. N., Barbara M. Bröker. (2014) *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. *Infect Genet Evol.* **21:583-92**
57. DuMont AL, T. V. (2014) Cell targeting by the *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: it's not just about lipids. *Trends Microbiol.* **22(1):21-7.**
58. Elisabeth, H. (2014) Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. *Université claude bernard lyon 1*
59. Wilmara Salgado-Pabón, A. H., Bao Gia Vu, Christopher S. Stach, Joseph Alan Merriman, Adam Russell Spaulding, and Patrick Schlievert. (2014) *Staphylococcus aureus* β-toxin Production is Common in Strains With the β-toxin Gene Inactivated by Bacteriophage. *J Infect Dis.* **Sep 1; 210(5): 784–792.**
60. WJ, S. (1953) Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 degrees C. *Aust J Biol Sci.* **6(4):549-64.**
61. Farrington M, B. N., Haines D, Walpole E. (1992) Resistance to desiccation and skin fatty acids in outbreak strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* **36(1):56-60.**
62. Jessica L. Lister, A. R. H. (2014) *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 178
63. Hans-Curt Flemming, J. W. (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **volume 8, pages 623–633**
64. Franklin, P. S. S. M. J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* **6(3):199-210**
65. Muhsin Jamal, W. A., Saadia Andleeb, Fazal Jalil, Muhammad Imrane, Muhammad Asif Nawaz, Tahir Hussain, Muhammad Ali, Muhammad Rafiq, Muhammad Atif Kamil. (2018) Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.*
66. Otto, M. (2008) Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* **322: 207–228.**
67. O'Neill, C. b. J. (2016) Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance*
68. Richard A. Proctor, A. K., Barbara C Kahl, Karsten Becker, Bettina Loeffler, Georg Peters. (2014) *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front Cell Infect Microbiol.* **4**, 99

69. Sabrina Lechner, K. L., Ralph Bertram. (2012) *Staphylococcus aureus* persisters tolerant to bactericidal antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol* **22**, 235-244
70. Curie, F. d. M. P. e. M. (2003) Cours Bactériologie **chapitre 2**
71. Sophie Jarraud, C. M., Jean Thioulouse, Gerard Lina, Hélène Meugnier, Françoise Forey, Xavier Nesme, Jerome Etienne, François Vandenesch. (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infection and Immunity* **70**, 631-641
72. Richmond, R. P. N. a. M. H. (1965) Nature and Interactions of the Genetic Elements Governing Penicillinase Synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **Vol. 90, No. 2**
73. Tomasz, S. G. a. A. (2014) Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **124**, 2836-2840
74. Nobelprize.org. (1945) Alexander Fleming.
75. Nobelprize.org. (1945) Erns Boris Chain
76. Nobelprize.org. (1945) Sir Howard Walter Florey
77. Christine L. Case, S. C. (2018) Photo découverte de la Penicilline sur boite de Petri. *ENS*
78. Hankin, E. H. (1896) L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. *Annales de l'Institut Pasteur* **10**, 511-523
79. Library., S. P. Photographie de Frédéric Twort.
80. France, B. n. d. (1905) Pasteuriens et personnalités du monde médical, 1868- 1970, Institut Pasteur (Paris). *Gallica*
81. Alain Dublanchet, E. F. (2008) Brève histoire de la phagothérapie. *j.medmal*
82. Stephen T Abedon, S. J. K., Bob G Blasdel and Elizabeth Martin Kutter. (2011) Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* **1**, 66-85
83. D'Herelle. (1925) Essai de traitement de la peste bubonique par le bacteriophage. *La presse médicale* **33**, 1393
84. J, M. (1935) Bacteriophage in cholera. Transactions of the RoyalSociety of Tropical Medicine. **28**
85. Institute, E. (2010) Short History *Eliava Institute website*
86. Helmut Ruska, B. v. B., Ernst Ruska. (1939) Die bedeutung der ubermikroskopie fur die virusforschung. *Arch Gesamte Virusforsch* **1 : 155-9**
87. Harald Brüssow, R. W. H. (2002) Phage Genomics: Small Is Beautiful. *Cell*, 13-16
88. Suttle, C. A. (2005) Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356-361
89. Jordan, F. M. (1945) Concerning Numbers of Valid Signatures Needed for an Initiative Law. *Cal West Med.* **63(3):153**
90. Barber, M. (1947) Staphylococcal Infection due to Penicillin-resistant Strains. *Br Med J.* **2(4534): 863–865.**
91. Kirby, W. M. M. (1944) Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* **99**, 452-453
92. Chambers, F. R. D. a. H. F. (2009) Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest* **119**, 2464-2474
93. Barber, M. (1961) Methicillin-resistant staphylococci. *14(4): 385–393.*
94. Kim, J. (2009) Understanding the Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Newsletter* **Vol. 31**, Pages 17-23
95. Gould, I. M. (2013) Treatment of bacteraemia: meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) to vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA). *Int J Antimicrob Agents* **42 Suppl**, S17-21
96. Francesca Prestinaci, P. P., and Annalisa Pantosti. (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health* **109**, 309-318
97. Services, C. U. S. D. o. H. a. H. (2013) Antibiotic resistance threats in the United State, 2013.
98. O'Neill, C. b. (2014) Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The Review on Antimicrobial Resistance*
99. LLP, K. (2014) The global economic impact of anti-microbial resistance.
100. O'Neill, C. b. J. (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations *The review on antimicrobial resistance*

101. Santé, O. m. d. l. (2016) Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens Manuel de mise en œuvre initiale. *Bibliothèque de l'OMS*
102. Peter de Man, B. A. N. V., Henri Verbrugh, Vos Margreet, Johannes van den Anker. (2000) An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet.* **2000 Mar 18;355(9208):973-8.**
103. H. Chaussade, S. S., L. Bernard, P. Coloby, L. Guy, G. Karsenty, C. Bastide, F. Bruyère. (2013) Les médicaments antibiotiques en urologie. *Association française d'urologie* **Prog Urol, 2013, 23, 15, 1327-1341**
104. Graeme N. Forrest, K. T. (2010) Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin Microbiol Rev* **23**, 14-34
105. Gray, D. D. a. J. (2004) Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Disease in Childhood* **89**, 74-77
106. Moreillon, P. (2008) New and emerging treatment of *Staphylococcus aureus* infections in the hospital setting. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 3**, 32-41
107. Jinjian Fu, X. Y., Cha Chen, Sidong Chen. (2013) The efficacy and safety of linezolid and glycopeptides in the treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *PLoS One* **8**, e58240
108. Losee L. Ling, T. S., Aaron J. Peoples, Amy L. Spoering, Ina Engels, Brian P. Conlon, Anna Mueller, Till F. Schäberle, Dallas E. Hughes, Slava Epstein, Michael Jones, Linos Lazarides, Victoria A. Steadman, Douglas R. Cohen, Cintia R. Felix, K. Ashley Fetterman, William P. Millett, Anthony G. Nitti, Ashley M. Zullo, Chao Chen & Kim Lewis. (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**, 455-459
109. Yoshikazu Kawai, K. M., Jeff Errington. (2018) Lysozyme Counteracts b-Lactam Antibiotics by Promoting the Emergence of L-Form Bacteria. *Cell* **172, 1038-1049**
110. Gilbert, N. (2018) Four stories of antibacterial breakthroughs Old drugs and new tricks keep researchers one step ahead of antibiotic resistance. *nature* **555, S5-S7**
111. Yvonne Neumann, K. O., Stefanie Donat, Susanne Engelmann, Harald Kusch, Dirk Albrecht, Michael Cartron, Alexander Hurd, and Simon J. Foster. (2015) The effect of skin fatty acids on *Staphylococcus aureus*. *Arch Microbiol* **197**, 245-267
112. Richard J. Heath, S. J. a. C. O. R. (2002) Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes Elsevier Science*, 55-92
113. Anna Kotronen, T. S.-L., Jukka Westerbacka, Tuula Kiviluoto, Johanna Arola, Anna-Liisa Ruskeepää, Hannele Yki-Järvinen, and Matej Orešič. (2010) Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum. *Obesity (Silver Spring)* **18**, 937-944
114. Andrew P Desbois, V. S. (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1629-1642
115. Joshua B. Parsons, M. W. F., Chitra M. Subramanian, Panatda Saenkham, Charles O Rock. (2011) Metabolic basis for the differential susceptibility of Gram-positive pathogens to fatty acid synthesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15378-15383
116. Morvan, C. (2015) Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay: *Staphylococcus aureus* adaptation to antimicrobials targeting Fatty Acid Synthesis II (FASII).
117. Elizabeth M Fozo, E. A. R. (2016) The Making and Taking of Lipids: The Role of Bacterial Lipid Synthesis and the Harnessing of Host Lipids in Bacterial Pathogenesis. *Advances in Microbial Physiology, Oxford: Academic Press* **Vol. 69**, pp. 51-155.
118. Wissman, P. Phospholipids and related complex lipids. *Santa monica college website*
119. (LadyofHats), M. R. V. (2013) Schéma d'un liposome, une micelle, et une bicouche lipidique.
120. Guoqing Xia, T. K., Andreas Peschel. (2010) The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **300**, 148-154
121. Yeagle, P. L. (2016) The Membranes of Cells (Third Edition) Chapter 12 – Lipid–Protein Interactions in Membranes. *Academic press* **Pages 291–334**
122. Eugenia Mileykovskaya, W. D. (2009) Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta* **Volume 1788, Issue 10,**, 2084-2091
123. Arnold S. Bayer, T. S., Hans-Georg Sahl. (2012) Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci* **1277**, 139-158

124. Reg P.Rehal Helene Marbacha, A. T. M. H. A. A. S., Federica Sebastiani, Giovanna Fragneto, Richard D.Harvey. The influence of mild acidity on lysyl-phosphatidylglycerol biosynthesis and lipid membrane physico-chemical properties in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemistry and Physics of Lipids* **Volume 206, August 2017, Pages 60-70**
125. Joshua B. Parsons, M. W. F., Pamela Jackson, Chitra Subramanian, and Charles O. Rock. (2014) Incorporation of Extracellular Fatty Acids by a Fatty Acid Kinase-Dependent Pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **92(2): 234–245.**
126. Christopher Richard Vickery, B. M. W., Heidi Gabrielle Morris, Richard Losick, and Suzanne Walker. (2018) Reconstitution of *S. aureus* lipoteichoic acid synthase activity identifies Congo red as a selective inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.*
127. Kiran B. Tiwari, C. G. a. B. J. W. (2018) Interrelationships among Fatty Acid Composition, Staphyloxanthin Content, Fluidity, and Carbon Flow in the *Staphylococcus aureus* Membrane. *molecules* **May 17;23(5). pii: E1201**
128. Nam JoongKima Ki, B., Jun Ho Jeonb Cheol-Heui Yunc, B. BrettFinlayd, Seung HyunHan. (2015) Lipoprotein in the cell wall of *Staphylococcus aureus* is a major inducer of nitric oxide production in murine macrophages. *Molecular Immunology* **Volume 65, Issue 1, May 2015, Pages 17-24**
129. Shideh V. Shahmirzadi, M.-T. N., and Friedrich Götz. (2016) Evaluation of *Staphylococcus aureus* Lipoproteins: Role in Nutritional Acquisition and Pathogenicity. *Front Microbiol.* **2016; 7: 1404.**
130. Sebastian Kuhn, C. J. S., Andreas Peschel. (2015) Synthesis and function of phospholipids in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **305**, 196-202
131. 1, I. K.-U. B. Figure phospholipides.
132. Poole, W. J. I. a. R. K. (1984) The Respiratory Chains of *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **Sept. 1984, p. 222-271**
133. N.C.S.Mykytczuk, J. T. T., L.G. Leduc, G.D. Ferroni. (2007) Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Prog Biophys Mol Biol* **95**, 60-82
134. Kolter, D. L. a. R. (2010) Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev.* **24(17): 1893–1902.**
135. Hans de Cock, M. P., Jan Tommassen and Emmanuelle Bouveret. (2001) Identification of phospholipids as new components that assist in thein vitrotrimerization of a bacterial pore protein. *Eur. J. Biochem* **268**
136. Joshua B. Parsons, T. C. B., Jeffrey L. Bose, Jason W. Rosch, Pamela Jackson, Chitra Subramanian, and Charles O. Rock. (2014) Identification of a two-component fatty acid kinase responsible for host fatty acid incorporation by *Staphylococcus aureus*. *PNAS* **111(29):10532-7**
137. Claire Morvan, D. H., Gérald Kénanian, Constantin Hays, Jamila Anba-Mondoloni, Sophie Brinster, Sean Kennedy, Patrick Trieu-Cuot, Claire Poyart, Gilles Lamberet, Karine Gloux & Alexandra Gruss. (2016) Environmental fatty acids enable emergence of infectious *Staphylococcus aureus* resistant to FASII-targeted antimicrobials. *Nature Communications*
138. Steinbüchel, H. J. J. a. A. (2014) Fatty acid synthesis in Escherichia coli and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnology for Biofuels* **7:7**
139. Joris Beld, D. J. L., and Michael D. Burkart. (2015) Fatty Acid Biosynthesis Revisited: Structure Elucidation and Metabolic Engineering. *Mol Biosyst.* **11(1): 38–59**
140. David I. Chan, H. J. V. (2010) Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical Journal* **430(1)1-19**
141. Joshua B.Parsons, C. O. R. (2013) Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog Lipid Res* **52**, 249-276
142. Keum-Hwa Choi, R. J. H., and Charles O. Rock. (2000) β-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) Is a Determining Factor in Branched-Chain Fatty Acid Biosynthesis. *J Bacteriol.* **182(2): 365–370.**
143. Atul K. Singh, Y.-M. Z., Kun Zhu, Chitra Subramanian, Zhong Li, Radheshyam K. Jayaswal, Craig Gatto, Charles O. Rock & Brian J. Wilkinson. (2009) FabH selectivity for anteiso branched-chain fattyacid precursors in low-temperature adaptation inListeria monocytogenes. *FEMS Microbiol Lett.* **301(2):188-92.**

144. Steinbüchel, H. J. J. a. A. (2014) Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol Biofuels.*
145. Kun Zhu, X. D., Mudcharee Julotok and Brian J. Wilkinson. (2005) Exogenous Isoleucine and Fatty Acid Shortening Ensure the High Content of Anteiso-C15:0 Fatty Acid Required for Low-Temperature Growth of Listeria monocytogenes. *Appl. Environ. Microbiol.* **vol. 71 no. 12 8002-8007**
146. Joshua B. Parsons, M. W. F., Jason W. Rosch and Charles O. Rock. (2013) *Staphylococcus aureus* Fatty Acid Auxotrophs Do Not Proliferate in Mice.
147. Rock, C. O. (2009) Opening a New Path to Lipoic Acid. *J Bacteriol.* **191(22): 6782–6784.**
148. Prigge, M. D. S. a. S. T. (2010) Lipoic Acid Metabolism in Microbial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology reviews* **June 2010, p. 200–228**
149. Obanbrahma. (2016) First Activation: Irreversible formation of malonyl-CoA by acetyl-CoA carboxylase. *SlideShare*
150. John W Campbell, R. M.-K., John Cronan. (2003) A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic beta-oxidation pathway. *Mol Microbiol* **47(3);793-805**
151. Clark, D. P. (1981) Regulation of fatty acid degradation in *Escherichia coli*: analysis by operon fusion. *J Bacteriol* **1981;148(2);521-6**
152. Cronan, R. M. M.-K. a. J. E. (2004) The *Escherichia coli* fadK (ydiD) gene encodes an anerobically regulated short chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **279(36);37324-33**
153. Rock, Y.-M. Z. a. C. O. (2009) Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J Lipid Res.* **50(Suppl): S115–S119.**
154. Wolfgang, J. M. E. a. M. J. (2012) A genetically encoded metabolite sensor for malonyl-CoA. *Chem Biol.* **19(10):1333-9.**
155. Mariano A Martinez, M.-E. Z., Francis Schaeffer, Marco Bellinzoni, Daniela Albanesi, Gustavo Enrique Schujman, Alejandro J. Vila, Pedro M Alzari, Diego de Mendoza. (2010) A novel role of malonyl-ACP in lipid homeostasis. *Biochemistry.* **49(14):3161-7.**
156. Gustavo E Schujman, D. d. M. (2008) Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **11(2):148-152**
157. Yasutaro Fujita, H. M., Kazutake Hirooka. (2007) Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol.* **66(4):829-39.**
158. Steinbüchel, H. J. J. a. A. (2014) Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnology for Biofuels* **20147:7**
159. Diego de Mendoza, A. K. U., John E. Cronan. (1983) Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. *J Biol Chem.* **258(4):2098-101.**
160. Joshua B. Parsons, J. Y., Matthew W. Frank, Charles O. Rock. (2015) FabH Mutations Confer Resistance to FabF-Directed Antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **59(2): 849–858**
161. Rock, Y.-M. Z. a. C. O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **6(3):222-33.**
162. Cronan, J. E. (2014) Biotin and Lipoic Acid: Synthesis, Attachment and Regulation. *EcoSal Plus.* **6(1):10.1128**
163. Joshua Parsons, M. W. F., Marc J Eleveld, Joost Schalkwijk, Tyler C. Broussard, Marien I de Jonge, Charles O Rock. (2015) A thioesterase bypasses the requirement for exogenous fatty acids in the plsX deletion of Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol.*
164. Atul K Singh, Y.-M. Z., Kun Zhu, Chitra Subramanian, Zhong Li, Radheshyam K Jayaswal, Craig Gatto, Charles O Rock, and Brian J Wilkinson. (2009) FabH selectivity for anteiso branched-chain fatty acid precursors in low temperature adaptation in Listeria monocytogenes. *FEMS Microbiol Lett.*
165. Rahul Saxena, N. F., Digvijay Patil, Anjali K. Sharma and Elliott Crooke (2013) Crosstalk between DnaA protein, the initiator of *Escherichia coli* chromosomal replication, and acidic phospholipids present in bacterial membranes. *International Journal of Molecular Sciences* **14(4):8517-37**
166. Suranjana Sen, S. S., Seth R. Johnson, Yang Song, Ryan Tefft, Craig Gatto, Brian J. Wilkinson. (2016) Growth-Environment Dependent Modulation of *Staphylococcus aureus* Branched-Chain to Straight-Chain Fatty Acid Ratio and Incorporation of Unsaturated Fatty Acids. *PLoS One* **11**, e0165300

167. Sophie Brinster, G. L., Bart Staels, Patrick Trieu-Cuot, Alexandra Gruss, Claire Poyart. (2009) Type II fatty acid synthesis is not a suitable antibiotic target for Gram-positive pathogens. *Nature* **458: 83-86.**
168. Jiangwei Yao, C. O. R. (2017) Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie.* **141 (2017) 30e39**
169. Jiangwei Yao, C. O. R. (2013) Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1831(3):495-502.**
170. Donald O. Chaffin, D. T., Shawn J. Skerrett, Craig E. Rubens (2012) Changes in the *Staphylococcus aureus* Transcriptome during Early Adaptation to the Lung. *PLoS One*
171. J. S. Sabirova, J.-P. E. C. H., Sarah De Backer, Basil Britto Xavier, Pieter Moons, Agata Turlej-Rogacka, Henri De Greve, H. Goossens, Surbhi malhotra-kumar. (2015) Fatty acid kinase A is an important determinant of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* USA300. *BMC Genomics* **16:861**
172. Phillip C. Delekta, J. C. S., Todd A Lydic, Martha H. Mulks, Neal D Hammer (2018) *Staphylococcus aureus* utilizes host-derived lipoprotein particles as sources of exogenous fatty acids. *J Bacteriol.* **pii: JB.00728-17.**
173. MinChu, R. M., Ling Xu, Shu-Wei Yang, Ling He, Mahesh Patel, Jill Stafford, David Macinga,Todd Black, Tze-Ming Chan, Vincent Gullo. (2003) Structure elucidation of Sch 538415, a novel acyl carrier protein synthase inhibitor from a microorganism. *Bioorg Med Chem Lett.* **Volume 13, Issue 21**
174. Adam M. Gilbert, M. K., Patrick Toy, David S. Nunn, Amadeo Failli, Elizabeth G. Dushin, Elena Novikova, Peter J. Petersen, Diane Joseph-McCarthy, Iain McFadyend and Christian C. Fritze. (2004) Anthranilate 4H-oxazol-5-ones: novel small molecule antibacterial acyl carrier protein synthase (AcpS) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14 (2004) 37–41**
175. Diane Joseph-McCarthy, K. P., Adrian Huang, Amedeo Failli, Dominick Quagliato, Elizabeth Glasfeld Dushin, Elena Novikova, Elena Severina, Margareta Tuckman, Peter J. Petersen, Charles Dean, Christian C. Fritz, Tova Meshulam, Maureen DeCenzo, Larry Dick, Iain J. McFadyen, William S. Somers, Frank Lovering, and Adam M. Gilbert. (2005) Use of structure-based drug design approaches to obtain novel anthranilic acid acyl carrier protein synthase inhibitors. *Send to J Med Chem.* **48(25):7960-9.**
176. Min Chu, R. M., Ling Xu, Shu-Wei Yang, Ling He, Mahesh Patel, Jill Stafford, David Macinga, Todd Black, Tze-Ming Chan, Vincent Gullo. (2003) Structure elucidation of Sch 538415, a novel acyl carrier protein synthase inhibitor from a microorganism. *Bioorg Med Chem Lett.* **13(21):3827-9.**
177. C. Freiberg, J. P., P. G. Nell, R. Endermann, J. Schuhmacher, B. Newton, M. Otteneder, T. Lampe, D. Häbich, and K. Ziegelbauer. (2006) Novel Bacterial Acetyl Coenzyme A Carboxylase Inhibitors with Antibiotic Efficacy *In Vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **50(8):2707-2712.**
178. Ting-Wan Lin, M. M. M., Daniel Kurth, S. Joshua Swamidass, John Purdon, Teresa Tseng, Gabriela Gago, Pierre Baldi, Hugo Gramajo, and Shiou-Chuan Tsai. (2006) Structure-based inhibitor design of AccD5, an essential acyl-CoA carboxylase carboxyltransferase domain of Mycobacterium tuberculosis. *PNAS* **103 (9) 3072-3077**
179. Mi Jin, M. A. F., and Jon Clardy. (2006) A biosynthetic gene cluster for the acetyl-CoA carboxylase inhibitor andrimid. *J Am Chem Soc.* **128(33):10660-10661**
180. Juliette Molnos, R. G., Glenn E Dale, Roland Lange. (2003) A continuous coupled enzyme assay for bacterial malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase (FabD). *Anal Biochem.* **319(1):171-6.**
181. Weizhi Liu, C. H., Lihong Hu, Kaixian Chen, Xu Shen, Hualiang Jiang. (2006) Characterization and inhibitor discovery of one novel malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase (MCAT) from *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett.* **580(2):697-702**
182. Reynolds, X. H. a. K. A. (2002) Purification, Characterization, and Identification of Novel Inhibitors of the β-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1310-1318
183. Sanjay S. Khandekar, D. R. G., Glenn S. Van Aller, Patrick Warren, Hong Xiang, Carol Silverman, Michael L. Doyle, Pamela A. Chambers, Alex K. Konstantinidis, Martin Brandt, Robert A. Daines and John T. Lonsdale. (2001) Identification, substrate specificity, and inhibition of the *Streptococcus*

pneumoniae beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH). *J Biol Chem.* **Aug 10;276(32):30024-30.**

184. Robert A. Daines, I. P., Kelvin Sham, Glenn S. Van Aller, Alex K. Konstantinidis, John T. Lonsdale, Cheryl A. Janson, Xiayang Qiu, Martin Brandt, Sanjay S. Khandekar, Carol Silverman, and Martha S. Head. (2003) First X-ray cocrystal structure of a bacterial FabH condensing enzyme and a small molecule inhibitor achieved using rational design and homology modeling. *J Med Chem.* **46(1):5-8.**
185. Xin He, A. M. R., Umesh R. Desai, Glen E. Kellogg, and Kevin A. Reynolds. (2004) 1,2-dithiole-3-ones as potent inhibitors of the bacterial 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *Antimicrob Agents Chemother.* **48(8):3093-102.**
186. Reynolds, H. T. W. a. K. A. (2007) Antibacterial Targets in Fatty Acid Biosynthesis. *Curr Opin Microbiol.* **10(5): 447–453.**
187. Fei Zhang, Q. W., She-Feng Wang, Baloch Shahla Karim,Yu-Shun Yang, Jia-Jia Liu, Wei-Ming Zhang, Hai-Liang Zhu. (2014) Design, synthesis and antibacterial activities of 5-(pyrazin-2-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol derivatives containing Schiff base formation as FabH inhibitory. *Bioorg Med Chem Lett.* **24(1):90-5.**
188. Yong-Mei Zhang, S. W. W. a. C. O. R. (2006) Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem.* **281(26):17541-4.**
189. Gopal R. Bommineni, K. K., Jason E. Cummings, Yang Lu, Susan E. Knudson, Chendi Gu, Stephen G. Walker, Richard A. Slayden, and Peter J. Tonge. (2016) Thiolactomycin-Based Inhibitors of Bacterial β-Ketoacyl-ACP Synthases with in Vivo Activity. *J Med Chem.* **59(11):5377-90.**
190. Srinivas Kodali, A. G., Katherine Young, Ronald Painter, Lynn L. Silver, Kithsiri B. Herath, Sheo B. Singh, Doris Cully, John F. Barrett, Dennis Schmatz and Jun Wang. (2005) Determination of selectivity and efficacy of fatty acid synthesis inhibitors. *J Biol Chem.* **280(2):1669-77**
191. Katherine Young, H. J., John G. Ondeyka, Kithsiri Herath, Chaowei Zhang, Srinivas Kodali, Andrew Galgoci, Ronald Painter, Vickie Brown-Driver, Robert Yamamoto, Lynn L. Silver, Yingcong Zheng, Judith I. Ventura, Janet Sigmund, Sookhee Ha, Angela Basilio, Francisca Vicente, José Rubén Tormo, Fernando Pelaez, Phil Youngman, Doris Cully, John F. Barrett, Dennis Schmatz, Sheo B. Singh, and Jun Wang. (2006) Discovery of FabH/FabF inhibitors from natural products. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(2):519-26.**
192. Katherine Young, H. J., John G. Ondeyka, Kithsiri Herath, Chaowei Zhang, Srinivas Kodali, Andrew Galgoci, Ronald Painter, Vickie Brown-Driver, Robert Yamamoto, Lynn L. Silver, Yingcong Zheng, Judith I. Ventura, Janet Sigmund, Sookhee Ha, Angela Basilio, Francisca Vicente, José Rubén Tormo, Fernando Pelaez, Phil Youngman, Doris Cully, John F. Barrett, Dennis Schmatz, Sheo B. Singh, and Jun Wang. (2006) Discovery of FabH/FabF inhibitors from natural products. *Antimicrob Agents Chemother.* **50(2):519-26.**
193. Jun Wang, S. M. S., Katherine Young, Wesley Shoop, Srinivas Kodali, Andrew Galgoci, Ronald Painter, Gopalakrishnan Parthasarathy, Yui S. Tang, Richard Cummings, Sookhee Ha, Karen Dorso, Mary Motyl, Hiranthi Jayasuriya, John Ondeyka, Kithsiri Herath, Chaowei Zhang, Lorraine Hernandez, John Allocco, Ángela Basilio, José R. Tormo, Olga Genilloud, Francisca Vicente, Fernando Pelaez, Lawrence Colwell, Sang Ho Lee, Bruce Michael, Thomas Felcetto, Charles Gill, Lynn L. Silver, Jeffery D. Hermes, Ken Bartizal, John Barrett, Dennis Schmatz, Joseph W. Becker, Doris Cully, Sheo B. Singh. (2006) Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature.* **441(7091):358-61.**
194. Jun Wang, S. K., Sang Ho Lee, Andrew Galgoci, Ronald Painter, Karen Dorso, Fred Racine, Mary Motyl, Lorraine Hernandez, Elizabeth Tinney, Steven L. Colletti, Kithsiri Herath, Richard Cummings, Oscar Salazar, Ignacio González, Angela Basilio, Francisca Vicente, Olga Genilloud, Fernando Pelaez, Hiranthi Jayasuriya, Katherine Young, Doris F. Cully, and Sheo B. Singh. (2007) Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104(18):7612-6.**
195. Sergio A. Mojica, O. S., Robert J. Bastidas, Naresh Sunduru, Mattias Hedenström, C. David Andersson, Carlos Núñez Otero, Patrik Engström, Raphael H. Valdivia, Mikael Elofsson, Åsa Gylfe. (2017) N-Acylated Derivatives of Sulfamethoxazole Block Chlamydia Fatty Acid Synthesis and Interact with FabF. *Antimicrob Agents Chemother.* **22;61(10)**

196. Michaela Wenzel, M. P., Dirk Albrecht, David Y.-K. Chen, K. C. Nicolaou, Nils Metzler-Nolte, and Julia E. Bandow. (2011) Proteomic Signature of Fatty Acid Biosynthesis Inhibition Available for In Vivo Mechanism-of-Action Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **Vol. 55, No. 6**, 2590–2596
197. Margaret Wu, S. B. S., Jun Wang, Christine C. Chung, Gino Salituro, Bindhu V. Karanam, Sang Ho Lee, Maryann Powles, Kenneth P. Ellsworth, Michael E. Lassman, Corey Miller, Robert W. Myers, Michael R. Tota, Bei B. Zhang, and Cai Li. (2011) Antidiabetic and antisteatotic effects of the selective fatty acid synthase (FAS) inhibitor platensimycin in mouse models of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108(13):5378-83.**
198. Rock, Y.-M. Z. a. C. O. (2004) Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *J Biol Chem.* **279(30):30994-1001.**
199. Veemal Bhowruth, A. K. B., and Gurdyal S. Besra. (2008) Synthesis and biological evaluation of NAS-21 and NAS-91 analogues as potential inhibitors of the mycobacterial FAS-II dehydratase enzyme Rv0636. *Microbiology.* **154(Pt 7): 1866–1875.**
200. Banerjee A, D. E., Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr. (1994) inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science.* **14;263(5144):227-30.**
201. Michael J Stewart, S. P., Guoping Xiao, Peter J Tonge, Caroline Kisker. (1999) Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. *J Mol Biol.* **290(4):859-65.**
202. David J. Payne, W. H. M., Valerie Berry, John Brosky, Walter J. Burgess, Emile Chen, Walter E. DeWolf, Jr., Andrew P. Fosberry, Rebecca Greenwood, Martha S. Head, Dirk A. Heerding, Cheryl A. Janson, Deborah D. Jaworski, Paul M. Keller, Peter J. Manley, Terrance D. Moore, Kenneth A. Newlander, Stewart Pearson, Brian J. Polizzi, Xiayang Qiu, Stephen F. Rittenhouse, Courtney Slater-Radosti, Kevin L. Salyers, Mark A. Seefeld, Martin G. Smyth, Dennis T. Takata, Irene N. Uzinskas, Kalindi Vaidya, Nicola G. Wallis, Scott B. Winram, Catherine C. K. Yuan, and William F. Huffman. (2002) Discovery of a Novel and Potent Class of FabI-Directed Antibacterial Agents. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(10): 3118–3124.**
203. Mark A. Seefeld, W. H. M., Kenneth A. Newlander, Walter J. Burgess, Walter E. DeWolf Jr.,Patricia A. Elkins, Martha S. Head, Dalia R. Jakas, Cheryl A. Janson, Paul M. Keller, Peter J. Manley,Terrance D. Moore, David J. Payne, Stewart Pearson, Brian J. Polizzi, Xiayang Qiu,Stephen F. Rittenhouse, Irene N. Uzinskas, Nicola G. Wallis, and William F. Huffman. (2002) Indole Naphthyridinones as Inhibitors of Bacterial Enoyl-ACP Reductases FabI and FabK. *J. Med. Chem.* **46, 1627-1635**
204. Nunn, W. D. (1977) Fatty Acid Synthesis in Escherichia coli Is Indirectly Inhibited by Phenethyl Alcohol. *16 (6), pp 1077–1081*
205. Rock, J. B. P. a. C. O. (2011) Is Bacterial Fatty Acid Synthesis a Valid Target for Antibacterial Drug Discovery? *Curr Opin Microbiol.* **14(5): 544–549.**
206. (NLM), N. L. o. M. (2018) Study of Debio 1450 for Bacterial Skin Infections.
207. H.N. Bhargava, P. A. L. B. (1996) Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control.* **24(3):209-18.**
208. Laura M. McMurry, M. O. S. B. L. (1998) Triclosan targets lipid synthesis. *Nature.* **394(6693):531-2.**
209. Rolf U. Halden, A. E. L., Allison E. Aiello, David Andrews, William A. Arnold, Patricia Fair, Rebecca E. Fuoco, Laura A. Geer, Paula I. Johnson, Rainer Lohmann, Kristopher McNeill, Victoria P. Sacks, Ted Schettler, Roland Weber,R. Thomas Zoeller, and Arlene Blum. (2017) The Florence Statement on Triclosan and Triclocarban. *Environ Health Perspect.* **125(6):064501.**
210. Gurpreet Singh Dhillon, S. K., Rama Pulicharla, Satinder Kaur Brar, Maximiliano Cledón, Mausam Verma, and Rao Y. Surampalli. (2015) Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *Int J Environ Res Public Health.* **12(5):5657-84**
211. Mats Allmyr, M. A.-E., Michael S. McLachlan, Gunilla Sandborgh-Englund. (2006) Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Sci Total Environ.* **372(1):87-93**
212. Adnan K. Syed, S. G., Nancy G. Love, Blaise R. Boles. (2014) Triclosan promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *MBio.* **5(2):e01015**

213. Halden, R. U. (2014) Response to Comment on "On the need and speed of regulating triclosan and triclocarban in the United States". *Environ Sci Technol.* **48(19):11023-4**
214. Gennady Cherednichenko, R. Z., Roger A. Bannister, Valeriy Timofeyev, Ning Li, Erika B. Fritsch, Wei Feng, Genaro C. Barrientos, Nils H. Schebb, Bruce D. Hammock, Kurt G. Beam, Nipavan Chiamvimonvat, and Isaac N. Pessah. (2012) Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca2+ dynamics in striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109(35):14158-63.**
215. Mei-Fei Yueh, K. T., Shujuan Chen, Ronald M. Evans, Bruce D. Hammock, Michael Karin, and Robert H. Tukey. (2014) The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111(48):17200-5.**
216. France, Z. (2017) Publicité dentifrice Zendium
217. Frank Fan, K. Y., Nicola G. Wallis, Shannon Reed, Terrance D. Moore, Stephen F. Rittenhouse, Walter E. DeWolf, Jr., Jianzhong Huang, Damien McDevitt, William H. Miller, Mark A. Seefeld, Kenneth A. Newlander, Dalia R. Jakas, Martha S. Head, and David J. Payne. (2002) Defining and combating the mechanisms of triclosan resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46(11):3343-7.**
218. Vincent Gerusz, A. D., Fabien Faivre, Yannick Bonvin, Mayalen Oxoby, Sophia Briet, Géraldine LeFralliec, Chrystelle Oliveira, Nicolas Desroy, Cédric Raymond, Laëtitia Peltier, François Moreau, Sonia Escaich, Vanida Vongsouthi, Stéphanie Floquet, Elodie Drocourt, Armelle Walton, Laure Prouvensier, Marc Saccomani, Lionel Durant, Jean-Marie Genevard, Vanessa Sam-Sambo, and Coralie Soulama-Mouze. (2012) From triclosan toward the clinic: discovery of nonbiocidal, potent FabI inhibitors for the treatment of resistant bacteria. *J Med Chem.* **5(22):9914-28**
219. Yun-Ju Kwon, H.-J. K., Won-Gon Kim. (2015) Complestatin exerts antibacterial activity by the inhibition of fatty acid synthesis. *Biol Pharm Bull.* **38(5):715-21.**
220. Chang Ji Zheng, M.-J. S., Sangku Lee, Won-Gon Kim. (2013) Meleagrin, a new FabI inhibitor from *Penicillium chryosogenum* with at least one additional mode of action. *PLoS One.* **8(11):e78922.**
221. Rock, J. Y. a. C. O. (2015) How bacterial pathogens eat host lipids: implications for the development of fatty acid synthesis therapeutics. *J Biol Chem.* **290(10):5940-6.**
222. Jiangwei Yao, J. B. M. a. C. O. R. (2013) Resistance to AFN-1252 arises from missense mutations in *Staphylococcus aureus* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI). *J Biol Chem.* **288(51):36261-71.**
223. Robert K. Flamm, P. R. R., Nachum Kaplan, Ronald N. Jones, David J. Farrell. (2015) Activity of Debio1452, a FabI inhibitor with potent activity against *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococcus spp., including multidrug-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59(5):2583-7**
224. Mohamed Takhi, K. S., Chandrashekar K. Reddy, Mahadari Munikumar, Kolakota Praveena, Pabolu Sudheer, Bandaru N.V.M. Rao, Gollamudi Ramakanth, Jampala Sivaranjani, Shardaprasad Mulik, Yeruva R. Reddy,Krishnamurthy Narasimha Rao, Rentala Pallavi, Anirudha Lakshminarasimhan, Sunil K. Panigrahi, Thomas Antony, Iskandar Abdullah, Yean K. Lee, Murali Ramachandra, Rohana Yusof, Noorsaadah A. Rahman, Hosahalli Subramanya. (2014) Discovery of azetidine based ene-amides as potent bacterial enoyl ACP reductase (FabI) inhibitors. *Eur J Med Chem.* **84:382-94.**
225. (NLM), N. L. o. M. (2012) Phase 2a Study of CG400549 for the Treatment of cABSSSI Caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (CG400549).
226. Thales Kronenberger, L. R. A. J., Carsten Wrenger, Gustavo Henrique Goulart Trossini, Kathia Maria Honorio, Vinicius Gonçalves Maltarollo. (2017) Studies of *Staphylococcus aureus* FabI inhibitors: fragment-based approach based on holographic structure–activity relationship analyses. *Future Med. Chem.* **9(2), 135–151**
227. Claire Morvan, D. H., Gérald Kénanian, Amit Pathania, Jamila Anba-Mondoloni, Gilles Lamberet, Alexandra Gruss, Karine Gloux. (2017) The *Staphylococcus aureus* FASII bypass escape route from FASII inhibitors. *Biochimie.* **141:40-46.**
228. Joshua B. Parsons, M. K., Pamela Jackson, Mark Pulse, Jerry W. Simecka, David Valtierra, William J. Weiss, Nachum Kaplan, Charles O. Rock. (2013) Perturbation of *Staphylococcus aureus* gene expression by the enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitor AFN-1252. *Antimicrob Agents Chemother.* **57(5):2182-90**

229. Maria Laura Ciusa, L. F., Daniel Knight, Francesca Decorosi, Marco Fondi, Carla Raggi, Joana RosadoCoelho, Luis Aragones, Laura Moce, Pilar Visa, Ana Teresa Freitas, Lucilla Baldassarri, Renato Fani, Carlo Viti, Graziella Orefici, Jose Luis Martinez, the BIOHYPO Consortium, Ian Morrissey, Marco Rinaldo Oggioni. (2012) A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* **40(3):210-20.**
230. Sissel Skovgaard , L. N. N., Marianne Halberg Larsen, Robert Leo Skov, Hanne Ingmer, Henrik Westh (2013) *Staphylococcus epidermidis* Isolated in 1965 Are More Susceptible to Triclosan than Current Isolates. *PLoS One*
231. Denis Grandgirard, L. F., Maria Laura Ciusa, Lucilla Baldassarri, Daniel R Knight, Ian Morrissey, Carlo R Largiadèr, Stephen L Leib and Marco R Oggioni. (2015) Mutations upstream of fabI in triclosan resistant *Staphylococcus aureus* strains are associated with elevated fabI gene expression. *BMC Genomics* **16:345**
232. Sophie Brinster, G. L., Bart Staels, Patrick Trieu-Cuot, Alexandra Gruss, Claire Poyart. (2010) Brinster et al. reply. *Nature* **463: E4-E4.**
233. Taeok Bae, E. M. G., Olaf Schneewind, Dominique Missiakas. (2008) Generating a collection of insertion mutations in the *Staphylococcus aureus* genome using bursa aurealis. *Methods Mol Biol.* **2008;416:103-16.**
234. Paul D. Fey, J. L. E., Vijaya Kumar Yajjala, Todd J. Widhelm, Robert J. Boissy, Jeffrey L. Bosse, Kenneth W. Bayles. (2013) A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *MBio.* **Feb 12;4(1):e00537-12**
235. Tyler C. Broussard, D. J. M., Pamela Jackson, Amanda Nourse, Stephen W. White, and Charles O. Rock. (2016) Biochemical Roles for Conserved Residues in the Bacterial Fatty Acid-binding Protein Family. *The Journal of Biological chemistry* **291**, 6296-6303
236. Leclercq, A.-L. P. a. R. (2005) Role of mutS and mutL Genes in Hypermutability and Recombination in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **vol. 187**
237. Yunfu Lin, a. J. H. W. (2007) Transcription-Induced CAG Repeat Contraction in Human Cells Is Mediated in Part by Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair. *Mol. Cell. Biol.* **27**
238. Danielle N. Atwood, K. E. B., Allister J. Loughran, Daniel G. Meeker, Tamara L. Lantz, Justin W. Graham, Horace J. Spencer, Mark S. Smeltzera. (2016) XerC Contributes to Diverse Forms of *Staphylococcus aureus* Infection via agr-Dependent and agr-Independent Pathways. *Infect Immun.* **24;84(4):1214-1225.**
239. Alison F. Chalker, A. L., Karen Ingraham, Chi Y. So, R. Dwayne Lunsford, Tong Li, Alexander Bryant, David J. Holmes, Andrea Marra, Stewart C. Pearson, Jennifer Ray, Martin K.R. Burnham, Leslie M. Palmer, Sanjoy Biswas, and Magdalena Zalacain. (2000) Genetic characterization of gram-positive homologs of the XerCD site-specific recombinases. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2(2):225-33.**
240. Konstanze Pohl, P. F., Ludwig Stenz, Frank Schlink, Tobias Geiger, Silvia Herbert, Christiane Goerke, Jacques Schrenzel, and Christiane Wolz. (2009) CodY in *Staphylococcus aureus*: a Regulatory Link between Metabolism and Virulence Gene Expression. *J Bacteriol.* **191(9): 2953–2963.**
241. INRA-MaIAGE. (2015) *S. aureus* Expression Data Browser.
242. Cornet, E. C. P. R. F. F. F. (2015) The FtsK Family of DNA Translocases Finds the Ends of Circles *J Mol Microbiol Biotechnol* **24:396–408**
243. Ryan T. Cirz, M. B. J., Neill A. Gingles, Timothy D. Minogue, Behnam Jarrahi, Scott N. Peterson, and Floyd E. Romesberg. (2007) Complete and SOS-Mediated Response of *Staphylococcus aureus* to the Antibiotic Ciprofloxacin. *J Bacteriol.* **189(2): 531–539.**
244. Nebraska, U. o. (2012) *Staphylococcus aureus* subsp. aureus USA300_FPR3757 f g x -functional genomics explorer.
245. Vineet K. Singh, S. S., Robert P. Ring, Saumya Singh, Craig Gatto and Brian J. Wilkinson. (2018) Roles of pyruvate dehydrogenase and branched-chain a-keto acid dehydrogenase in branched-chain membrane fatty acid levels and associated functions in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* **2018;67:570–578**

246. Ludwig Stenz, P. F., Katrine Whiteson, Christiane Wolz Patrick Linder, Jacques Schrenzel. (2011) The CodY pleiotropic repressor controls virulence in gram-positive pathogens. *FEMS Immunol & Medical Microbiolgy* **Jul;62(2):123-39**
247. Agnès Roux, Daniel A. Todd, Jose V. Velázquez,, Nadja B. Cech, and Abraham L. Sonenshein. (2014) CodY-Mediated Regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr System Integrates Nutritional and Population Density Signals. *J Bacteriol.* **196(6): 1184–1196.**
248. Julienne C. Kaiser, A. N. K., Jason C. Grigg, Jessica R. Sheldon, David R. Edgell, Michael E. P. Murphy, Shaun R. Brinsmade, David E. Heinrichs. (2018) Repression of branched-chain amino acid synthesis in *Staphylococcus aureus* is mediated by isoleucine via CodY, and by a leucine-rich attenuator peptide. *Plos Genetics*
249. Tobias Geiger, C. W. (2014) Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **304 (2014) 150–155**
250. Bouveret, A. B. a. E. (2009) Bacteria Possessing Two RelA/SpoT-Like Proteins Have Evolved a Specific Stringent Response Involving the Acyl Carrier Protein-SpoT Interaction. *J Bacteriol.* **191(2): 616–624.**
251. Schreiber G, R. E., Glaser G. (1995) ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in Escherichia coli. *30(1):27-32.*
252. John P. Santa Maria Jr., A. S., Samir H. Moussa, Stephanie Brown, Yanjia J. Zhang, Eric J. Rubin, Michael S. Gilmore, and Suzanne Walker. (2014) Compound-gene interaction mapping reveals distinct roles for *Staphylococcus aureus* teichoic acids. *PNAS* **111 (34) 12510-12515**
253. Olaf Schneewind, D. M. (2014) Lipoteichoic Acids, Phosphate-Containing Polymers in the Envelope of Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* **196 no. 6 1133-1142**
254. Christoph M. Ernst, P. S., Nagendra N. Mishra, Soo-Jin Yang, Gabriele Hornig, Hubert Kalbacher, Arnold S. Bayer, Dirk Kraus, Andreas Peschel. (2009) The Bacterial Defensin Resistance Protein MprF Consists of Separable Domains for Lipid Lysinylation and Antimicrobial Peptide Repulsion. *Plos Pathogens*
255. A. Kovacs-Simon, R. W. T., and S. L. Michell. (2011) Lipoproteins of Bacterial Pathogens. *Infection and Immunity* **Feb. 2011, p. 548–561**
256. Janion, C. (2008) Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in Escherichia coli. *Int J Biol Sci.* **4(6): 338–344.**
257. Abdulwahab A. Al-Deib, A. A. M., Robert G. Lloyd. (1996) Modulation of Recombination and DNA Repair by the RecG and PriA Helicases of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **178**, 6782–6789
258. Aureowiki/NCBI. (2017) Opéron recG.
259. Paul K. Fyfe, A. D., Marie-Theres Hutchison, Scott Cameron, and William N. Huntera. (2010) Structure of *Staphylococcus aureus* adenylo-succinate lyase (PurB) and assessment of its potential as a target for structure-based inhibitor discovery. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **Aug 1; 66(Pt 8): 881–888.**
260. Heba Alnaseri, B. A., James E T Schneider, Julienne C Kaiser, Zachariah C Scinocca, David E Heinrichs, Martin J. McGavin. (2015) Inducible Expression of a Resistance-Nodulation-Division-Type Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Provides Resistance to Linoleic and Arachidonic Acids. *J Bacteriol.* **197(11):1893-905.**
261. Ji Lu Min Jin, S. H. N., Likai Mao, Jie Li, Lachlan J.M. Coin, Zhiguo Yuana, Jianhua Guo. (2018) Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation. *Environment International* **118**, 257-265
262. Pinho, H. V. a. M. G. (2016) *Staphylococcus aureus* requires at least one FtsK/SpoIIIE protein for correct chromosome segregation. *Molecular Microbiology* **103(3), 504–517**
263. Walter W Steiner, G. L., William D. Donachie, Peter Kuempel. (1999) The cytoplasmic domain of FtsK is required for resolution of chromosome dimers. *Molecular Microbiology* **31(2):579 - 583**
264. Thomas H Massey, L. A., François-Xavier Barre, and David J Sherratt. (2004) Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep.* **5(4): 399–404.**
265. Hervé Capiaux, C. L., Koryn Pérals, Jean Michel Louarn, and François Cornet. (2002) A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep.* **3(6):532-6.**

266. Jacqueline Corre, J.-M. L. (2002) Evidence from terminal recombination gradients that FtsK uses replichore polarity to control chromosome terminus positioning at division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **184(14):3801-7.**
267. Tobias Geiger, C. G., Michaela Fritz, Tina Schäfer, Knut Ohlsen, Manuel Liebeke, Michael Lalk and Christiane Wolz. (2010) Role of the (p)ppGpp Synthase RSH, a RelA/SpoT Homolog, in Stringent Response and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *american Society for Microbiology Infection and Immunity* **78**
268. Tobias Geiger, P. F., Manuel Liebeke, Martin Fraunholz, Christiane Goerke, Bernhard Krismer, Jacques Schrenzel, Michael Lalk, Christiane Wolz. (2012) The Stringent Response of *Staphylococcus aureus* and Its Impact on Survival after Phagocytosis through the Induction of Intracellular PSMs Expression. *Plos Pathogens*
269. Allergy, N. I. o. (2018) BEI resources supporting infectious desease research.
270. Center, U. o. N. M. (2012) *Staphylococcus aureus* subsp. aureus USA300_FPR3757, functional genomics explorer.
271. Karine Gloux, M. G., Charles Soler, Claire Morvan, David Halpern, Christine Pourcel, Hoang Vu Thien, Gilles Lamberet, and Alexandra Gruss. (2017) Clinical Relevance of Type II Fatty Acid Synthesis Bypass in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**
272. Errington, J. (2017) Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective. *Biochem Soc Trans.* **45(2):287-295.**
273. Matsumoto, K. (2001) Dispensable nature of phosphatidylglycerol in Escherichia coli: dual roles of anionic phospholipids. *Molecular Microbiology* **(2001) 39(6), 1427-1433**
274. Emmanuel Denou, R. D. P., Bernard Berger, Jean-Michel Panoff, Fabrizio Arigoni,and Harald Brüssow. (2008) Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic Lactobacillus johnsonii strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *J Bacteriol.* **190(9):3161-8.**
275. Rottem, J. D. K. a. S. (2012) The Phospholipid Profile of Mycoplasmas. *Journal of Lipids* **640762, 8 pages**
276. Minyan Song, Y. H., Huangkai Zhou, Yi Zhang, Xizhi Li & Ying Yu. (2016) Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Scientific Reports* **6, Article number: 29390**

Titre : *Staphylococcus aureus* se met transitoirement en dormance pour utiliser les acides gras de l'hôte et échapper à une inhibition par un anti-FASII : quel signal active son réveil ?

Mots clés : résistance aux antibiotiques, biochimie des membranes, dormance, microbiologie médicale, innovation

Le traitement des infections dues aux bactéries multirésistantes aux antibiotiques est un défi médical majeur du 21ème siècle. Ce défi a incité la recherche de cibles ayant des fonctions essentielles pour le développement de nouveaux antibiotiques. Les enzymes de la voie FASII, responsables de la synthèse des acides gras (AG), sont considérées comme essentielles et de nombreux antibiotiques, appelés anti-FASII, ont été développés pour lutter contre des pathogènes du phylum des Firmicutes. Cependant, notre laboratoire a montré que plusieurs pathogènes contournent l'inhibition des anti-FASII par l'utilisation des AGs exogènes abondants chez l'hôte (sang, organes, aliments). Ce contournement compromet l'utilisation des anti-FASII en traitement. Le statut du pathogène majeur, *Staphylococcus aureus*, est néanmoins resté en débat. Il synthétise un AG non disponible chez l'hôte, et donc, d'après la littérature, ne pourrait pas être compensé. La question de cette thèse est de comprendre les mécanismes utilisés par *S. aureus* lui permettant de contourner les anti-FASII. Deux mécanismes sont mis en évidence: **I**- Des mutations à haute fréquence du gène *fabD* surviennent et permettent à la bactérie d'utiliser des AGs exogènes. Ce type de mutation favorise la disponibilité de la protéine ACP permettant l'utilisation des AGs exogènes. **II**- Une stratégie sans mutation décelable survient en présence de fluides hôtes tels que le sérum. Elle comprend une première étape de "dormance" d'environ 8 à 10 heures pendant laquelle des AGs sont incorporés. Durant cette adaptation les bactéries semblent bloquées dans la division cellulaire, et subissent des changements morphologiques. Cette étape est suivie par une reprise de croissance « normale » où *S. aureus* utilise librement des AGs exogènes et reste insensible aux anti-FASII. Dans nos conditions, une étude microscopique « time-lapse », a permis de visualiser qu'environ 3% de la population bactérienne adaptée aux anti-FASII émerge. Nos résultats pointent vers un mécanisme d'adaptation dans lequel le sérum diminuerait le stress bactérien et augmenterait ainsi la disponibilité de l'ACP et des AGs exogènes, facilitant leur utilisation pour la synthèse des phospholipides. Les AGs exogènes peuvent donc remplacer totalement les endogènes. Ce résultat va à l'encontre de l'hypothèse couramment acceptée qu'un AG endogène de *S. aureus* est conservé et essentiel. Nous avons poursuivi cette étude par des analyses protéomiques et par le criblage d'une banque de 2000 mutants de *S. aureus* en cherchant des loci impliqués dans l'adaptation aux anti-FASII. Des fonctions de la réponse au stress, la division cellulaire et le métabolisme des lipides semblent être impliqués dans cette adaptation. Pour conclure, cette étude a permis de clarifier les étapes impliquées dans la réponse adaptative de *S. aureus* aux anti-FASII. Même si nos résultats prouvent que *S. aureus* contourne les anti-FASII, une approche combinatoire pourrait être envisagée où l'anti-FASII serait couplé avec un deuxième inhibiteur qui bloquerait sa capacité à sortir de la dormance.

Title: *Staphylococcus aureus* undergoes transient dormancy and uses host fatty acids to bypass FASII inhibition: what's the wakeup signal?

Keywords : antibiotic resistance, membrane biochemistry, dormance, medical microbiologie, innovation

Treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria is a major medical challenge of the 21st century, which has stimulated the search for essential bacterial functions as potential antimicrobial drug targets. The fatty acid synthesis (FASII) pathway enzymes are considered essential, and numerous antibiotics called (anti-FASII), have been developed to eliminate pathogens of the Firmicutes phylum. However, our laboratory has shown that several pathogens bypass FASII inhibitors by incorporating exogenous fatty acids (FAs), which are abundant in the host (in blood, organs and foods). FASII bypass thus compromises the use of FASII-based antibiotics. The status of the major pathogen, *Staphylococcus aureus*, has remained in debate. *S. aureus* synthesizes an FA not produced by the host and according to the literature, is required and would not be available in the host. However, work in my lab showed that indeed bypasses FASII. The goal of my research project is to understand the mechanisms used by *S. aureus* to bypass FASII antibiotics. Two mechanisms are highlighted: **I**- High frequency mutations of the *fabD* gene allow *S. aureus* to use exogenous FAs; our study indicates that higher availability of ACP in these mutants facilitates FA utilization. **II**- A strategy without detectable mutation occurs in the presence of host fluids such as serum. It comprises a first "dormancy" step of about 8 to 10 hours, followed by outgrowth; FAs are incorporated throughout these steps. The latency phase appears to be due to a division block, during which cells undergo morphological changes. During "normal" growth recovery, *S. aureus* freely uses exogenous FAs and remains insensitive to anti-FASII. Using « time-lapse » microscopic study, we showed in our test conditions that about 3% of the bacterial population adapted to FASII antibiotics. Ours results point to an adaptation mechanism in which serum decreases bacterial stress, leading to increased availability of ACP and exogenous FAs. These substrates can then be used for phospholipid synthesis. These results resolve the debate by showing that *S. aureus* can replace endogenous FAs with exogenous FAs when FASII is blocked. Contrary to current dogma, FASII is not essential in *S. aureus*. To identify the loci involved in adaptation to anti-FASII, we performed proteomic analyses and also screened a *S. aureus* mutant library. Functions of stress response, cell division, and lipid metabolism appear to be involved in this adaptation. To conclude, this study clarified the steps leading to *S. aureus* adaptation to FASII antibiotics. Although our results show that *S. aureus* bypasses anti-FASII, a combinatorial approach could be considered in which FASII antibiotics could be coupled to a second inhibitor that would prevent exit from the dormancy

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France